UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO ESCRITO VIA CURSO DE EDUCACIÓN CONTINUA:

ESPECTROSCOPIA DE **M**OVILIDAD **I**ÓNICA (**EMI**) COMO TÉCNICA ANALÍTICA PARA ANALIZAR MUESTRAS DE VALIDACIÓN DE LIMPIEZA.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

OSCAR ALEJANDRO GONZÁLEZ RIVERA

MÉXICO, D.F. MARZO DEL 2010.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Georgina Margarita Maya Ruiz

VOCAL: Profesor: Pedro Salvador Valadez Eslava

SECRETARIO: Profesor: María Eugenia Ivette Gómez Sánchez

1er. SUPLENTE: Profesor: Ricardo Meza Pérez

2° SUPLENTE: Profesor: Jorge Rafael Martínez Peniche

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA: PEDRO SALVADOR VALADEZ ESLAVA

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): OSCAR ALEJANDRO GONZÁLEZ RIVERA

(nombre y firma)

A mis padres:

Por su apoyo incondicional,
paciencia y gran amor.

A mi hermano:

Por su complicidad, sus consejos
y amistad.

A mis abuelitos Rosa y Pepe:

Por su cariño, consejos, ejemplo
y sabiduría.

A mi tía Paty:

Por su gran apoyo y amor.

**A todas aquellas personas que colaboraron
para la realización de este trabajo**

A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

A LA FACULTAD DE QUIMICA

A Todos aquellos maestros que contribuyeron
en mi formación profesional.

AL Q.F.B. Pedro Salvador Valadez Eslava,
profesor y amigo quien me brindó su apoyo
y conocimiento para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS ---------- 6

2. INTRODUCCIÓN ---------- 6

3. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA ---------- 7

4. TIPOS DE MUESTREOS EN EQUIPOS DE PRODUCCIÓN FARMACÉUTICA ----8

5. TÉCNICAS ANALÍTICAS MAS COMUNES PARA DETERMINAR INGREDIENTES ACTIVOS EN EQUIPOS DE PRODUCCIÓN FARMACÉUTICA ----------14

6. ESPECTROSCOPIA DE MOVILIDAD IÓNICA (EMI), TECNOLOGÍA DISPONIBLE AL ALCANCE DE LAS INDUSTRIAS FARMACÉUTICAS ----------16

7. COMPONENTES DE UN EQUIPO DE ESPECTROSCOPIA DE MOVILIDAD IÓNICA ----------18

8. CONCLUSIONES ----------29

9. BIBLIOGRAFIA ----------31

OBJETIVOS:

- Conocer las ventajas que presenta la **E**spectroscopia de **M**ovilidad **I**ónica (**EMI**), en comparación a los instrumentos más utilizados en la industria farmacéutica para analizar muestras de validación del proceso de limpieza.

- Evaluar la posibilidad de implantar el uso de la **EMI** en la industria farmacéutica para analizar muestras que validen la limpieza del equipo mediante el recobro por hisopo.

INTRODUCCIÓN:

Las industrias farmacéuticas están obligadas a validar sus procesos de limpieza para asegurar que cumplen con la Buenas Prácticas de Manufactura, así como con regulaciones nacionales e internacionales.[1]

Hoy en día cada industria farmacéutica debe contar con documentación que detalle sus procedimientos de limpieza así como la validación de estos, dicha validación requiere el desarrollo de un método analítico para la verificación de la limpieza, lo suficientemente sensible para detectar las sustancias al límite de aceptación de residuo (LAR). [2]

La presencia de residuos por contaminación cruzada puede tener efectos adversos en la calidad del producto farmacéutico y por consiguiente es un riesgo para los pacientes; para limitar este riesgo, enfoques científicos deben adoptarse en todos los aspectos de la limpieza y en los programas de validación de limpieza.

Es por ello que validar los procedimientos de limpieza nos ayuda a prevenir de manera potencial grandes consecuencias de la contaminación cruzada de productos.

La validación de limpieza es tener evidencia documentada que garantice que los procedimientos de limpieza siempre logran la eliminación de los residuos a niveles predeterminados de aceptabilidad, lo cual permite poder establecer y demostrar " un estado limpio " asegurando la calidad del producto.[3]

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006 de Buenas Prácticas de Fabricación y la Food and Drugs Administration (FDA) a través del CFR parte 21 exigen la validación de los métodos de limpieza, la especificidad de sus exigencias ha aumentado a medida que se trabaja con principios activos más potentes.

Expresamente, las empresas tienen que desarrollar y documentar procedimientos que demuestren el muestreo eficiente de los equipos así como el correcto análisis de los muestreos, para producir una medida que dé con alto grado de confianza y la suficiente información para soportar el “estado limpio" de los equipos. Hasta que este estado limpio no sea obtenido, los procesos de la fabricación de determinada línea en particular o equipos de producción no se deben emplear para fabricar otro producto.

El impacto financiero que causa el tiempo de inactividad de los equipos de fabricación es considerable en una industria donde las sumas desorbitadas del dinero son vertidas en la investigación y desarrollo con los ciclos que pueden durar casi 15 años y costar más de 800 millones de dólares por cada principio activo, y en el desarrollo donde los gastos están a la par con productos que tienen un período de patente, las empresas deben maximizar ganancias de cada principio activo que ellos producen para recuperar la inversión del desarrollo.

Es por ello que las industrias farmacéuticas deben utilizar de la mejor manera sus recursos económicos, dado que al estar obligadas a validar sus procesos de limpieza se encuentran en la necesidad de contar con la mejor tecnología disponible de análisis para obtener resultados rápidos, confiables y repetibles, para poder asegurar y garantizar la calidad de sus productos con base a las exigencias que actualmente se requieren

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA:

Las empresas tienen varias opciones para muestrear y analizar con eficiencia los residuos presentes en los equipos de producción, la elección de los métodos de muestreo y de su análisis dependerá de la naturaleza de los residuos y de los equipos de fabricación, pero el objetivo debe ser establecer un nivel de recobro reproducible en las superficies de los equipos.

En la validación de la limpieza se debe establecer mediante el estudio del “Peor Caso”, la sustancia más difícil de limpiar y el cálculo del límite de aceptación de residuo, para ello es necesario realizar la medición de equipos, conocer los tamaños de lote, etc.

TIPOS DE MUESTREOS EN EQUIPOS DE PRODUCCIÓN FARMACÉUTICA

El muestreo por enjuague y por hisopo son métodos comúnmente empleados para recuperar el residuo de las superficies de los equipos, aunque la inspección visual también es extensamente usada como un criterio en conjunto con otros métodos. [4]

El muestreo de los equipos de producción farmacéutica se lleva a cabo por:

- **Muestreo por hisopo**
- **Muestreo por enjuague con agua**
- **Muestreo con solvente**
- **Muestreo con placas**
- **Muestreo con placebo**
- **Muestreo con producto**

Muestreo por hisopo:

Es una técnica que se basa en una combinación de procesos físicos y químicos, mediante el uso de un material de absorción para recuperar mediante fricción los residuos de la superficie del equipo.

El proceso físico comprende las características físicas del hisopo y de la superficie a muestrear, así como los movimientos del hisopo a utilizar.

La parte química pertenece a la disolución del analito de la superficie al hisopo humedecido y la extracción del activo del hisopo.

Para realizar este tipo de muestreo, en primer lugar los hisopos son saturados con disolvente, lo que ayuda a la solubilización de los residuos existentes en la superficie; el disolvente debe ser compatible con el método analítico y con la naturaleza del analito.

Los hisopos se saturan con el disolvente mediante la introducción de este en un tubo que contenga el disolvente a utilizar, posteriormente se procede a la remoción del residuo en la superficie del equipo, el tamaño de la superficie a muestrear del equipo debe ser establecida previamente, en base a la sensibilidad del instrumento que será utilizado para el análisis del analito, a la solubilidad y estabilidad del analito, etc. por ejemplo 25 cm^2 o 65 cm^2. Durante el muestreo se deben realizan movimientos de fricción sobre la superficie del equipo de manufactura, asegurando cubrir toda la superficie establecida y utilizando los cuatro lados del hisopo, ay que recordar que los hisopos de uso farmacéutico utilizados en la validación de limpieza son planos, teniendo una cara frontal y una posterior y que las uniones laterales de esas dos caras se toman en cuenta también como otros dos lados del hisopo, finalmente se regresa el hisopo al tubo que contiene el disolvente para que posteriormente en el laboratorio se realicen los pasos de extracción y análisis del activo.

Debido a que éste es un método de muestreo directo que remueve la muestra mediante acción mecánica y química sobre la superficie del equipo, es el método ideal para los lugares donde las superficies son de fácil acceso a la mano o el brazo, pueden utilizarse herramientas de extensión disponibles, pero es importante que sean validadas para su uso.

Existen diferentes tipos de hisopos, dependiendo del tamaño del área que se desea muestrear, por ejemplo pueden utilizarse los hisopos mostrados en las figuras 1, 2, 3, y 4 los cuales pertenecen a la marca TXWIPE, los cuales son comúnmente utilizados en la industria farmacéutica debido a su baja cantidad de extractables, lo cual los hace muy útiles en casi cualquier tipo de análisis, así como el hecho que la gran mayoría de los hisopos que ofrece esta marca no requieren un pretratamiento para poder ser utilizados en la limpieza de los equipos de manufactura.

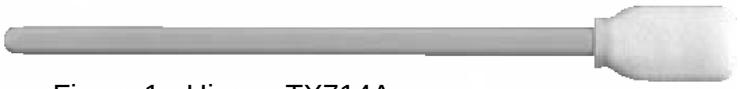

Figura 1.- Hisopo TX714A.

El diseño del hisopo TX714A (Figura 1), permite muestrear grandes superficies planas, cuenta con cabeza de poliéster la cual es sumamente limpia proporcionando un fondo neutro para la muestra obtenida, mango largo y rígido; al tener una pala delantera interna con gran tamaño proporciona un apoyo firme.

Figura 2.- Hisopo TX761

El hisopo TX761 (Figura 2), cuenta con una pequeña esponja la cual permite un excelente uso general para limpiar pequeñas áreas.

Su cabeza tejida es de poliéster y al ser lavada y planchada, es sumamente limpia. Cuenta con un mango compacto y el centro de la cabeza es rígido en su interior lo cual o proporciona el apoyo y control necesario para efectuar un buena limpieza. Su pequeña punta es ideal para limpiar superficies pequeñas.

Figura 3.- Hisopo TX716

El hisopo TX716 (Figura 3), cuenta con una esponja de muestreo fabricada con el 100 % de poliester hidroenredado, la cual no contiene ninguna contaminación por surfactantes. La ausencia de estos surfactantes hace a estas esponjas el instrumento ideal para el empleo en la Validación de Limpieza de equipos que son utilizados en la fabricación de principios activos, excipientes y productos biotecnológicos.

La cabeza de poliéster proporciona niveles de recuperación excelentes debido a que atrapa muestras en la estructura de la esponja sin adherirse a la muestra, permitiendo la liberación completa en el diluyente. Esta esponja es la más eficaz con diferentes tipos de solventes además del agua.

La esponja tiene una manija de polipropileno rígida que proporciona el apoyo firme al muestreo de amplias áreas y superficies planas. La zona de ruptura de la manija permite a la cabeza poder ser colocada en un frasco de muestreo con el mínimo manejo.

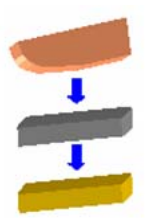

Figura 4.- Hisopo especial para el Instrumento Kaye Validator ® ITMS [9]

Referencia: Derek Brand, Mei Guo, Dr. Ralf Wottrich and Tim Wortley; Direct Swabbing and Surface Recovery with Ion Trap Movility Spectrometry.

En la Figura 4 se observa de color amarillo el hisopo especial para el Kaye Validator ® ITMS hecho de poliamida, de color gris se puede observar lo que es una protección para el hisopo hecho de PTFE, el cual es un polímero similar al polietileno, sobre esta protección se coloca el dedo del operador que realiza el muestreo evitando así contaminarlo.

Muestreo por enjuague con agua:

No utiliza la acción mecánica sobre la superficie de los equipos, sino que una cantidad conocida de agua pasa por la superficie para recoger los residuos existentes y posteriormente se toma una alícuota para su análisis en el laboratorio.

Este muestreo se puede recolectar de dos formas diferentes, la primera como parte del enjuague final de la limpieza y la segunda como un enjuague aplicado específicamente con propósito de recolectar la muestra de análisis de limpieza.

Presenta ventajas el realizarlo de la segunda forma, es decir utilizar un enjuague adicional de manera específica para recolectar la muestra, más que como parte del enjuague final, debido a que:

1. El proceso de limpieza se encuentra realmente en su conclusión, cuando la muestra se recolecta.
2. La cantidad de solución de enjuague puede ser reducida para el muestreo, evitando así que la muestra este demasiado diluida para el análisis.
3. Al tomar un volumen de enjuague menor, se puede realizar una mejor homogenización antes de tomar las alícuotas de la muestra para el laboratorio
4. La toma de muestras por enjuague puede ser dirigida a zonas específicas lo que resulta en el muestreo de puntos críticos.

Al igual que con la técnica de muestreo por hisopo, el disolvente empleado para la toma de muestras de enjuague debe ser seleccionado basándose en la solubilidad, compatibilidad y toxicidad del residuo.

Muestreo con solvente:

Esta técnica se basa en el uso de un solvente que normalmente no se utiliza durante el proceso de limpieza, esto para maximizar el recobro de los residuos.

Esta se basa en que una vez que el equipo ya se encuentra limpio y ya ha sido enjuagado con agua para poder ser utilizado, se utiliza la aplicación de un volumen conocido de determinado solvente, como por ejemplo Metanol, Etanol, Acetonitrilo, etc. sobre la superficie del equipo a evaluar.

El solvente aplicado es después colectado y una alícuota es tomada para su análisis en el laboratorio.

Este tipo de muestreo es apropiado para piezas grandes del equipo y puede ser usado en combinación con el método de hisopo.

Muestreo con placas:

Esta técnica consiste en colocar sobre los equipos de producción placas hechas con el mismo material del que está construido el equipo a ser limpiado, se realiza el proceso de manufactura y después de que el producto ha estado en contacto con todo el equipo incluyendo las placas de muestreo, se realizan los procedimientos de limpieza en el equipo, posteriormente se retiran las placas del equipo de producción y son llevadas al laboratorio para ser sometidas a los diversos procedimientos de recobro del analito, mediante los cuales se extraerá de la superficie de la placa para su análisis.

Muestreo con placebo:

Este tipo de muestreo es utilizado para detectar residuos en el equipo mediante la producción de un lote de placebo subsecuente al proceso de limpieza.

Es apropiado para residuos de activos, agentes de limpieza, y pruebas microbiológicas, es ampliamente utilizado para recoger residuos de colorantes de lotes anteriores, debido a que si el color del placebo es blanco se podrá observar de inmediato los residuos de los colorantes, ya que la gran ventaja que presenta el usar este tipo de muestreo es que el lote placebo circula por los mismos lugares que por donde pasó el lote anterior con principio activo.

El muestreo con lotes placebos se utiliza principalmente para demostrar que no existen residuos remanentes del producto anterior que se estén transfiriendo al siguiente producto manufacturado, por ello el placebo debe imitar los atributos del producto que se manufacturó.

Las características del equipo influyen en la elección del tamaño del lote placebo.

Muestreo con producto:

Esta técnica de muestreo es similar al muestreo con placebo, excepto que utiliza el producto real; una vez que se fabrica un producto en determinado equipo se limpia y prepara para la siguiente producción de un lote nuevo de un producto diferente al que se habia manufacturado previamente; se toman determinadas muestras de este nuevo lote y se hace un análisis detallado en busca de residuos del producto que se manufacturo previo al que se tomaron la muestras para su análisis.[6]

Las técnicas analíticas más comunes para determinar ingredientes activos en equipos de producción farmacéutica son:

- **C**romatografía de **L**íquidos de **A**lta **R**esolución **(CLAR)**
- **C**arbón **O**rgánico **T**otal **(COT)**
- **E**spectroscopia de **M**ovilidad **I**ónica **(EMI)**

Para poder determinar la cantidad de ingrediente activo en el residuo muestreado, las industrias farmacéuticas y biotecnológicas comúnmente usan métodos analíticos como la **C**romatografía de **L**íquidos de **A**lta **R**esolución (**CLAR**) y la medición del **C**arbón **O**rgánico **T**otal (**COT**).

Actualmente la cromatografía de líquidos continúa siendo la técnica analítica más extensamente utilizada en la validación y verificación de la limpieza en la industria farmacéutica. Esta técnica tiene varias ventajas, incluyendo un alto nivel de especificidad y la versatilidad para medir mezclas de diferentes tipos de residuos. La cromatografía de líquidos se basa en la interacción entre los compuestos en una fase líquida "móvil" y una fase sólida "estacionaria" para separar y cuantificar compuestos de una mezcla, con propiedades particulares ya sean físicas o químicas como la carga, tamaño molecular, o la polaridad.

El hecho de que la cromatografía de líquidos continúe siendo el método analítico más utilizado trae consigo una gran desventaja en la validación y verificación de la limpieza, que es el costo asociado a cada análisis, ya que un solo análisis puede tardar de 15 a 30 minutos por lo que el tiempo de laboratorio que se invierte en el análisis de todas las muestras de un solo estudio puede tomar desde un día a dos semanas, dependiendo del laboratorio. Este período de espera es una de las causas de origen de mayor pérdida de tiempo en la validación y verificación de la limpieza.

El análisis por **C**arbón **O**rgánico **T**ota**l** es comúnmente utilizado en aplicaciones biotecnológicas. El **COT** es un método no específico, la medición que realiza es la cantidad total presente de carbón orgánico en una muestra y no hace distinción de las fuentes de carbón para identificar la entidad molecular. El modo de asegurar que la carencia de especificidad no representa estar subestimando la presencia de un compuesto particular es, asumiendo que todo el carbón medido por ésta técnica es atribuido "al peor caso". Usando esta estrategia, es como el **COT** ha sido aceptado como un método analítico válido para limpieza.

La principal ventaja consiste en que la tecnología del **COT** permite obtener los resultados con gran rapidez en valores de carbón total; lo cual es útil en aplicaciones de limpieza en el área de biotecnología donde proteínas desnaturalizadas raras veces pueden ser identificadas como el producto "activo" en una droga después de que el proceso de limpieza ha sido completado.

Para realizar una medición adecuada con esta técnica, las muestras deben ser solubles en agua, ya que los solventes orgánicos contribuyen en la medición del carbón total. Finalmente, al atribuir todo el carbón medido al activo es la manera en que se obtiene la aceptación de la técnica, esto fundamentalmente baja los límites del umbral para un “estado limpio”, y puede causar falsos resultados positivos en el estado de limpieza.

Espectroscopia de Movilidad Iónica (EMI), tecnología disponible al alcance de las Industrias Farmacéuticas.

Esta tecnología es actualmente utilizada en la mayor parte de los aeropuertos como parte de sus procedimientos de seguridad y durante más de 30 años, la espectroscopia de movilidad iónica ha sido muy útil al aplicarse en el rastreo y detección de drogas y explosivos. [7]

La tecnología en la que se basa la **E**spectrometría de **M**ovilidad **I**ónica tiene el potencial para ser extensamente utilizada en la validación y verificación de la limpieza en la industria farmacéutica, ya que permite identificar los diferentes tipos de compuestos en una mezcla así como determinar la cantidad en que se encuentran presentes.

La Espectroscopia de Movilidad Iónica está construida sobre el principio de medir la velocidad de flujo de los iones mientras los iones son impulsados por un " flujo de gas " vía la fuerza de un campo eléctrico.

Tiene la capacidad de detectar trazas de compuestos específicos mediante la vaporización y la ionización de la muestra, mide la velocidad a la cual el ión se mueve, a través del aire a presión atmosférica en un campo eléctrico.

La **EMI** es una técnica rápida para el análisis de muestras para la validación y verificación de la limpieza en la industria farmacéutica.

Ésta se basa en el principio de que la velocidad media de un ión (V) en un tubo de flujo es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado (E). Este factor de escalamiento lineal se conoce como " la movilidad del ión " el cual es un constante (K).[8]

Las muestras tanto sólidas o líquidas son introducidas directamente al analizador mediante una desorción térmica, los vapores resultantes son ionizados en un ambiente controlado (la región de ionización), para producir iones moleculares o racimos de iones moleculares.

Los iones son introducidos en un tubo de flujo, donde ellos chocan con moléculas neutras de algún gas inerte como helio, nitrógeno, etc. a presión atmosférica antes de llegar al colector.

Los iones fluyen a través del tubo mediante la generación de una corriente eléctrica y los iones son separados según su tamaño y forma al inicio del tiempo de flujo en un intervalo de 3-50 ms (milisegundos).

Los iones más grandes tienen vuelos de flujo más largos que los iones más pequeños como consecuencia de sus áreas más grandes.

La identificación exacta está basada en la detección de picos dentro de 0.04 ms de sus posiciones esperadas.

Una gran ventaja que presenta la **E**spectroscopia de **M**ovilidad **I**ónica es el poder analizar muestras que han sido colectadas mediante métodos de muestreo directo, es decir permite analizar de inmediato una muestra que ha sido tomada directamente de la superficie del equipo, evitando la inclusión de pasos intermedios como la extracción o dilución de la muestra.

La ventaja del muestreo directo consiste en que permite al usuario del instrumento obtener los resultados sin la necesidad de enviar las muestras al laboratorio analítico, ahorrando así valioso tiempo. Además que actualmente se encuentran disponibles instrumentos de **EMI** con gran transportabilidad lo cual permite realizar y completar los análisis en línea.

Es importante recalcar que independientemente del método de muestreo elegido, así como del método analítico mediante el cual se analizarán las muestras a evaluar para realizar la validación de la limpieza, es expresamente necesario conocer la recuperación que se obtiene describiendo así la eficacia de la combinación del muestreo y del método analítico, para demostrar que los contaminantes son retirados de la superficie del equipo y en que nivel, es decir que porcentaje de recuperación se obtiene.

Al establecer los límites residuales máximos permitidos a encontrar después de la limpieza, debemos de asegurarnos de que estos valores sean alcanzables y comprobables, teniendo por seguro que quedan por debajo de cualquier nivel tóxico permitido, así como que el método analítico utilizado incluyendo el instrumento para realizar la medición tiene el nivel preciso de sensibilidad para estas mediciones.

Componentes de un equipo de Espectroscopia de Movilidad Iónica:

Los equipos Espectroscopia de Movilidad Iónica esencialmente están compuestos por:

- La zona de introducción de la muestra.
- La zona de ionización.
- Un tubo de flujo con un campo eléctrico.
- Un detector.

En particular, el instrumento Kaye Validator incorpora el uso de una “trampa de ión", que permite a los iones almacenarse en un área atrapada y luego ser liberados de manera periódica dentro del tubo de flujo para así realizar la medición.

Figura 5. Instrumento Kaye Validator ® ITMS [8]

El objetivo de utilizar esta técnica es identificar los compuestos de interés en muestras tomadas del equipo después de que a estos se les ha realizado la limpieza y determinar si la cantidad del compuesto detectado se encuentra por debajo del límite preestablecido para la limpieza.

El instrumento Kaye Validator ® ITMS contiene un desorbedor que tiene la capacidad de calentar la muestra para llevarla a una fase de vapor. El vapor pasa a través de una membrana de silicio, que mantiene fuera del sistema los contaminantes ambientales. Más allá de la membrana se encuentra un loop de aire que utiliza dos secadores regenerativos para mantener un estado de humedad muy bajo.[9]

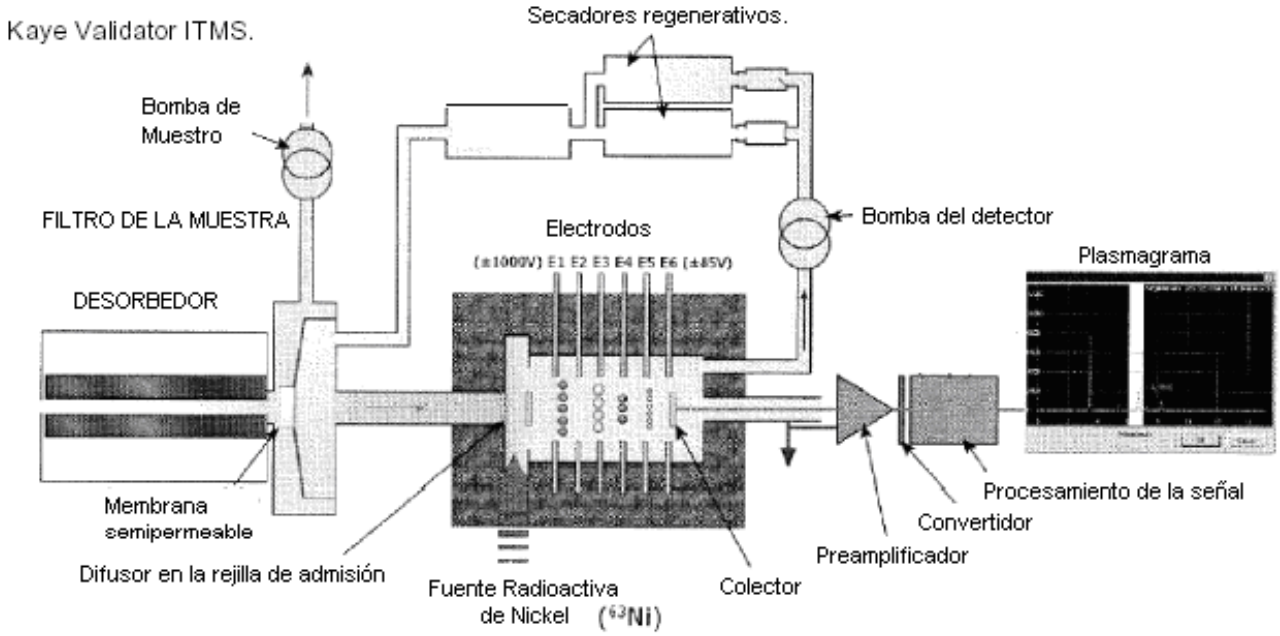

Figura 6. Esquema Interno del Instrumento Kaye Validator ® ITMS [8]

Una vez dentro del loop de aire, el vapor pasa dentro de la cámara de muestra, donde las moléculas son bombardeadas con electrones provenientes de una fuente de radioactividad (Ni-63), creando la especie del ión tanto positiva como negativa.

Las puertas en la trampa de ión se abren y cierran en pulsos a 33Hz permitiendo a la muestra pasar al tubo de flujo donde entra en un campo eléctrico de 1000V y vuela hacia el detector.

La polaridad del campo eléctrico oscila en conjunción con la trampa de ión, de manera que envía alternadamente iones cargados positiva y negativamente hacia el tubo de flujo. Esto permite al Instrumento Kaye Validator ® ITMS mostrar la información tanto para los iones positivos como para los iones negativos después de cada sesión de escaneo sin tener que cambiar de modo. El detector al final del tubo mide el tiempo de vuelo para cada especie ionizada.

Estos equipos cuentan con una calibración interna, mediante el uso de una sustancia conocida, basándose en verificar la movilidad que presenta el ión para asegurar que el instrumento esta funcionando adecuadamente.

Para que la espectroscopia de movilidad iónica sea útil como técnica analítica para analizar muestras de validación de limpieza se debe tomar en cuenta que:

La identificación de moléculas en una mezcla está basada en el **T**iempo **D**e **V**uelo de la molécula (**TDV**), el cual es directamente proporcional a la colisión efectiva de la molécula en su sección transversal, esencialmente relacionado con el tamaño de la molécula. El tiempo de vuelo de la molécula llega a ser su "huella digital" que no cambiará, independientemente de otras moléculas presentes en el sistema, mientras que las características físicas del instrumento (voltaje del campo eléctrico, la longitud del tubo de flujo) permanezcan constantes.

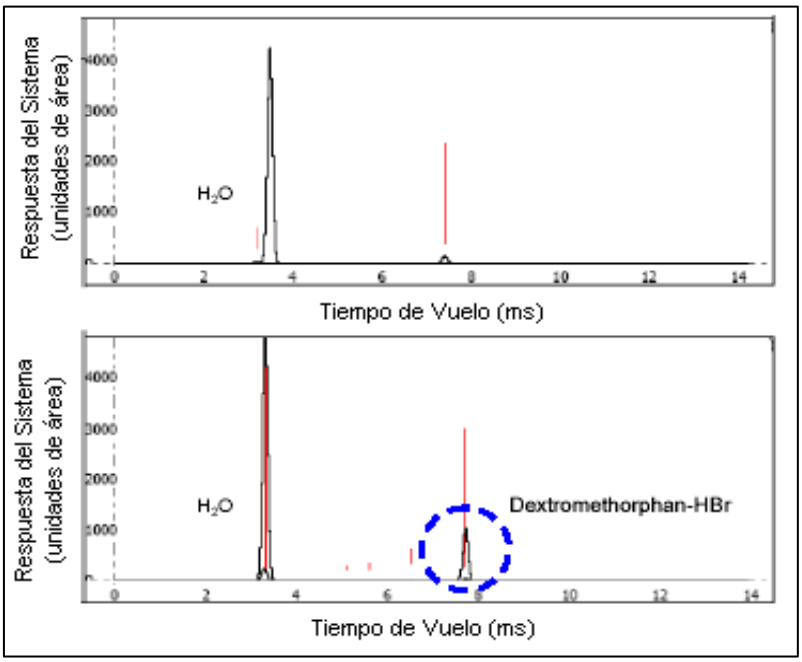

Gráfico 1

Gráfico 2

Gráfico 1 y 2.- Plasmagramas del Hidrobromuro de Dextrometorfano.[8]

Los gráficos 1 y 2 muestran un ejemplo de la salida bidimensional que se obtiene del sistema al introducir una muestra que contiene Hidrobromuro de Dextrometorfano, después de la colección de los datos, a cada uno de estos gráficos se les conoce como plasmagramas; en el gráfico 1 podemos observar los datos de los iones positivos y el gráfico 2 nos muestra los datos de los iones negativos en el sistema.

El agua en el sistema es mostrada como un pico prominente tanto en los datos positivos como en los negativos, y es fácilmente identificable, por lo que no debe ser interpretada como un pico "desconocido" durante el desarrollo del método.

Mientras los secadores regenerativos sirven para mantener el loop del aire interior tan seco como sea posible, siempre existe rastro de vapor de agua presente.

Una vez que se ha establecido cual es el activo de interés se debe determinar su tiempo de vuelo, en el plasmagrama.

En el gráfico 1 correspondiente a los iones positivos se puede observar el pico correspondiente al Hidrobromuro de Dextrometorfano y es fácilmente identificable en este caso con un **TDV** de 7.698 ms.

También se observa presente un pequeño pico en los datos de iones negativos. Esto se debe a un complejo de ión negativo del Hidrobromuro de Dextrometrofano. Es común para las moléculas formar tanto picos de iones negativos como positivos, y uno de ambos picos será formado de manera preferencial. En el caso del Hidrobromuro de dextrometorfano, el pico positivo es el que se forma de manera preferencial y éste es el que debe de ser utilizado para realizar la curva de calibración y cuantificación.

Una vez que se ha determinado cual es el ión que se forma de manera preferencial y el tiempo de vuelo del principio activo se procede a determinar la estabilidad que presenta el pico con base al incremento de la cantidad muestreada.

Posteriormente se debe es realizar una curva de calibración para el ingrediente activo, para poder conocer en que zona de la curva se obtiene una respuesta lineal a la cantidad de ingrediente activo agregado y con base en ello desarrollar el método analítico a través del cual se validará la limpieza.

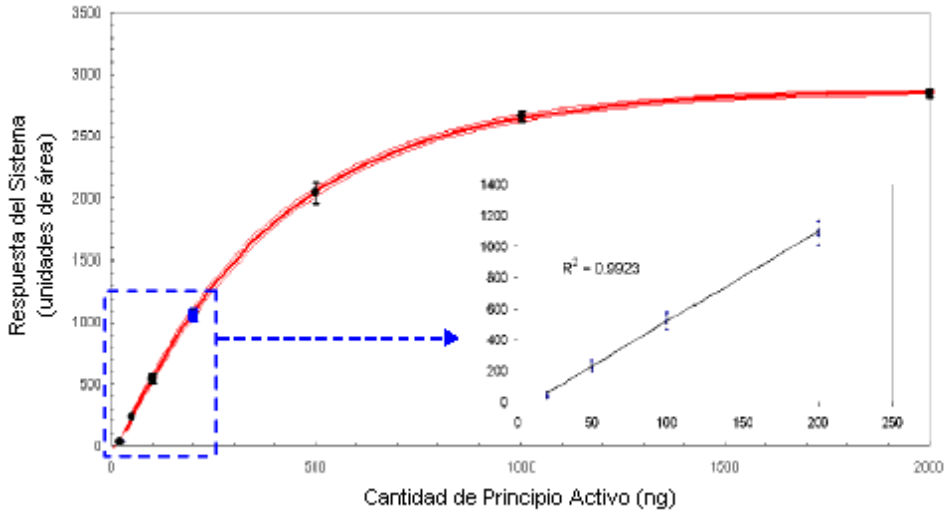

Gráfico 3.- Curva de Calibración [8]

Como ejemplo tenemos el gráfico 3 donde se muestra una típica curva de calibración para un ingrediente activo, en este caso Hidrobromuro de Dextrometorfano, se observa que la respuesta incrementa al aumentar la cantidad de muestra, sin embargo la respuesta no es lineal en toda la curva, solo mantiene la relación lineal a bajas cantidades.

Presentando una linealidad de la respuesta entre 20 y 200 ng de muestra con un valor de r^2 de 0.9923 [8]

El poder describir la curva de calibración con base en la respuesta del sistema para una sustancia particular nos permite realizar la determinación de los límites de detección (repetibilidad en la detección de bajas cantidades de muestras) y de cuantificación (la capacidad de cuantificar la cantidad de muestra existente en las regiones más altas de la curva de respuesta).

La determinación de los límites residuales para un compuesto en particular se pueden realizar usando la dosis máxima aceptable que se puede transferir al siguiente lote o producto, o bien empleando valores como el DL50 (Cantidad o dosis de una sustancia que produce la muerte en la mitad de los animales probados). [8]

El amplio intervalo de límites residuales existentes para la limpieza en la industria farmacéutica desafía los métodos analíticos utilizados para determinarlos, pero independientemente de si el método de muestreo utilizado es de tipo directo o uno que confía en la remoción y la dilución; el método analítico tiene que tener el margen apropiado para demostrar que la medición que se está realizando de la sustancia en el límite de limpieza se hace con un apropiado intervalo líneal, para así poder asegurar la capacidad para diferenciar con eficacia un resultado exitoso de un fracaso.

En este caso para el hidrobromuro de dextrometorfano, al considerar el volumen y solvente utilizado en la muestra, se puede obtener un intervalo amplio de cuantificación (20 ng – 1757 ng), y una desviación estándar relativamente muy baja (el 1.6 % en 1000 ng).

Estos parámetros ofrecen un amplio intervalo de mediciones y un nivel de precisión que sería ampliamente aceptable como un método analítico en la práctica.

Es importante recalcar que los límites, la desviación estándar relativa de las mediciones dentro del intervalo de cuantificación, pueden ser afectados por varios factores incluyendo el solvente usado para la dilución, el tiempo de integración en la medición, la temperatura del desorbedor, etc.

La combinación óptima de los factores experimentales, alcanzados a través del desarrollo experimental, deberá producir un procedimiento robusto de medición que será útil en la práctica.

Como ya se había mencionado al inicio la Espectroscopia de Movilidad de Iónica (**EMI**) cuenta con una gran capacidad para analizar muestras tomadas mediante el uso de muestreo directo en la superficie de los equipos de producción, conociendo así residuos que se encuentran presentes aun después de la limpieza del equipo, así como de poder analizarlos de manera inmediata con la obtención de muy buenos porcentajes de recobro.

Lo cual es demostrado en una serie de experimentos publicados en el artículo Direct Swabbing and Surface Recovery with Ion Trap Movility Spectrometry [9], donde utilizando dos diferentes activos, una de las sustancias seleccionadas es la cefuroxima, clasificada

como un antibiótico β-lactámico el cual cuenta con muy bajos límites residuales de limpieza permitidos debido a las severas reacciones alérgicas y shock anafiláctico que puede producir en algunos casos de ingestión por los pacientes; el segundo compuesto es Clorhidrato de Pseudoefedrina con límites de limpieza relativamente altos en comparación a la cefuroxima.

El objetivo del experimento publicado fue demostrar que la **E**spectrometría **M**ovilidad **I**ónica puede ser utilizada para realizar análisis de muestreos directos con la capacidad de generar niveles de recobro aceptables a través de un amplio intervalo de límites residuales de limpieza.

En dicho experimento se utilizó el Espectrómetro Kaye Validator ® ITMS para la medición de las muestras. Las muestras fueron preparadas utilizando cefuroxima y Clorhidrato de Pseudoefedrina grado USP y las diluciones tanto para la linealidad del sistema como para evaluar los recobros fueron preparadas en metanol, la diferencia es que las alícuotas para determinar la linealidad del sistema se inocularon de manera directa en los hisopos y las alícuotas para determinar el porcentaje de recobro fueron inoculadas en placas de acero inoxidable (316), a las cuales se les permitió secar y posteriormente se les realizó la remoción de los activos mediante el muestreo directo utilizando hisopos de un material especial, poliamida los cuales son fabricados especialmente para emplearse con el Espectrómetro Kaye Validator ® ITMS.

Como ya se estableció previamente la Espectroscopia de Movilidad Iónica usa el tiempo de vuelo como una medida para identificar a la molécula, por lo que en la primera etapa se determina el tiempo de vuelo tanto para la cefuroxima como para el Clorhidrato de Pseudoefedrina.

Para determinar la respuesta cuantitativa del sistema, es importante conocer el tiempo de vuelo para la molécula en cuestión. Como ya se mencionó anteriormente el instrumento utilizado en este estudio tiene la capacidad de obtener datos tanto para iones positivos como para negativos con una sola medición. Lo cual trae varias ventajas potenciales, como la capacidad para detectar múltiples especies de los iones independientemente de la carga que presente el estado preferencial del ión en una sola exploración.

El artículo en cuestión hace mención de diferentes experimentos para obtener los tiempos de vuelo tanto para la cefuroxima como para el clorhidrato de pseudoefedrina, y

así obtener los plasmagramas representativos con las posiciones de los picos de los principios activos, así como las posiciones del pico correspondiente al gas de flujo.

El tiempo de vuelo que menciona el artículo para la cefuroxima fue determinado siendo un ión positivo en 7.790 ms y el tiempo de vuelo para el clorhidrato de pseudoefedrina determinado siendo un ion positivo en 5.885 ms.

Después de haber determinado el tiempo de vuelo para cada principio activo, se debe determinar la respuesta cuantitativa que presente el instrumento para cada principio activo manteniendo un intervalo lineal.

El artículo menciona que el intervalo lineal para la cefuroxima con un valor de $r^2 > 0.95$ y abarcan cantidades de la muestra entre 500 ng y 1.5 μg. Como el instrumento fue capaz de dar una respuesta repetible en 250 ng este valor es el que utilizan como límite de cuantificación, y fue perceptible con cantidades por debajo de los 250 ng, por lo que se asume que el límite de detección es por debajo de 250 ng.

En el caso del clorhidrato de pseudoefedrina el intervalo lineal mencionado es de 10-25 μg con un valor de $r^2 > 0.95$. Los límites de detección y cuantificación los establecen por debajo de 5 μg.

Para establecer los porcentajes de recobro, el muestreo por hisopo lo realizan sobre placas de acero inoxidable 316, con un área de 25 cm^2 cada una. Saturando con determinadas alícuotas para cada muestra y se dejando secar previo al muestreo.

El material del que están constituidos los hisopos para el muestro es poliamida, el cual es especialmente desarrollado para su uso con el instrumento Kaye Validator ® ITMS. Los hisopos cuentan con un " área de muestreo" específica que es completamente analizada por el instrumento.

El operador encargado de realizar el muestreo utiliza una barrera de PTFE entre su dedo y el hisopo.

La manera en se realiza el muestreo en el artículo es mediante movimientos traslapados sobre la superficie, es decir el operador realizó ocho movimientos verticales, seguido de ocho que se superponen en movimientos horizontales.

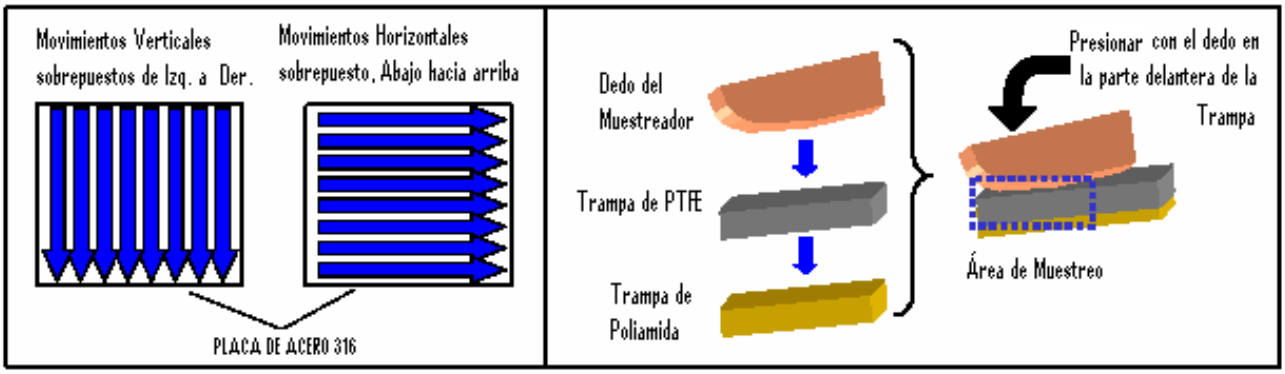

Figura 7.- Técnica y material del hisopo utilizado para el Muestreo[9]

Para realizar un correcto muestreo con hisopo, el que desarrolla ésta técnica debe asegurarse que la cantidad de movimientos que realice sobre la superficie a muestrear, esté cubriendo toda la superficie, ya que al desarrollar la técnica de muestreo se establece el número de pases sobre el área determinada y estos se establecen con base al área a muestrear, al tamaño del hisopo e incluso en los resultados obtenidos, debido a que si los porcentajes de recobro son demasiado bajos, debe de evaluarse si el error proviene de una mala técnica de muestreo, mala capacitación del operador, tamaño o tipo de hisopo, pues es posible que el material del que este constituido el hisopo esté interfiera con el análisis o que el principio activo no sea fácilmente extraído del material que constituye al hisopo.

Después de haber muestreado el artículo menciona que se dejó secar el material utilizado para ello y fueron analizados con el sistema de **E**spectroscopia de **M**ovilidad **I**ónica, registrando así las áreas de los picos correspondientes al principio activo y la cantidad presente determinada mediante la ecuación generada en la curva de calibración.

DATOS DEL RECOBRO DE LA CEFUROXIMA		
Cantidad Agregada en la placa de acero, (n)	**Promedio de la Cantidad Recobrada**	**% de Recobro**
1.5 Microgramos (n=7)	1.02 Microgramos	67.2 %
1 Microgramo (n= 11)	660 Nanogramos	65.6 %
500 Microgramos (n=7)	310 Nanogramos	62 %
Promedio de Recobro por Hisopo		65.1 %
CV del Recobro por hisopo		4.1 %

DATOS DEL RECOBRO DEL CLORHIDRATO DE PSEUDOEFEDRINA		
Cantidad Agregada en la placa de acero, (n)	**Promedio de la Cantidad Recobrada**	**% de Recobro**
15 Microgramos (n=8)	13.34 Microgramos	88.9 %
20 Microgramos (n=8)	17.07 Microgramos	85.3 %
Promedio de Recobro por Hisopo		87.1 %
CV del Recobro por hisopo		2.9 %

El artículo muestra mediante dos tablas los resultados obtenidos de los recobros, mostrando así que obtuvieron un porcentaje de recobro mayor al 65 % y repetibilidad con un CV del 4.1 % para la cefuroxima y un porcentaje de recuperación mayor al 87 % para el clorhidrato de pseudoefedrina con un CV por debajo del 3 %. Además los porcentajes de recobro en los diferentes niveles muestran ser consistentes para el experimento. [9]

Con base en los resultados mencionados por el artículo, podemos decir que es posible obtener niveles de recobro de los residuos y sus mediciones con alta repetibilidad mediante el muestreo directo utilizando la **E**spectroscopia de **M**ovilida **I**ónica.

Mientras este experimento muestra la viabilidad de la técnica, el método en sí mismo tiene el potencial para ser mejorado de modo que sea posible obtener recobros más altos. Dado que alteraciones en la presión y la velocidad del muestreo, la orientación de los movimientos, la cantidad de solvente utilizado podrían conducir a porcentajes de recobro más altos.

Los estudios reportados en los artículos mencionados demuestran la viabilidad de usar la **EMI** para el muestreo directo de equipos en la industria farmacéutica. Así como la capacidad de producir los niveles aceptables de recobro del ingrediente activo y su repetibilidad con una técnica que es mucho más rápida que la tecnología actualmente usada por la mayor parte de la industria farmacéutica.

Es importante recalcar que los límites, la desviación estándar relativa de las mediciones dentro del intervalo de cuantificación, pueden ser afectados por varios factores incluyendo el solvente usado para la dilución, el tiempo de integración en la medición, la temperatura del desorbedor y otros factores comunes para mediciones analíticas.

La combinación óptima de los factores experimentales, alcanzados a través de desarrollo experimental, deberá producir un procedimiento robusto de medición que será útil en la práctica.

CONCLUSIONES:

Mientras que la Espectroscopia de Movilidad Iónica demuestra ser una técnica analítica robusta, una vez que sea validada, su mayor ventaja es la capacidad de medir muestras de una manera muy rápida y el gran potencial que ofrece para ser empleado en línea.

A diferencia de una **C**romatografía de **L**íquidos de **A**lta **R**esolución, la medición que se puede realizar con un sistema basado en la **E**spectroscopia de **M**ovilidad **I**ónica toma entre diez segundos y un minuto.

El método de introducción de muestras permite realizar el muestreo con hisopos especiales y se colocan directamente en el instrumento sin los pasos intermedios que corresponderían a la dilución o extracción que se tendrían que llevar a cabo con otras técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Es importante saber que el instrumento también tiene la capacidad de aceptar muestras que han sido diluidas en caso de que la cantidad esperada del residuo proveniente del muestreo directo exceda la capacidad de detección del sistema.

La industria de la seguridad usa de manera muy común el método de muestreo directo y si se aplicara a la validación y verificación de la limpieza en la industria farmacéutica podría disminuir significativamente el tiempo de espera que actualmente es una desventaja al utilizar la cromatografía de líquidos. Adicionalmente, el muestreo directo ofrece un método específico que es tan rápido como el **C**arbón **O**rgánico **T**otal en la obtención de resultados.

No hay duda de que la **E**spectroscopia de **M**ovilidad **I**ónica **EMI** proporciona una importante innovación tecnológica, al ser un método con grandes posibilidades de ser específico, además de ser rápido para cuantificar residuos después de la limpieza lo que beneficia en una significativa disminución en el tiempo de espera experimentado tanto en la fabricación así como en la validación y en la verificación de la limpieza.

Al utilizar la **EMI** como técnica analítica para analizar muestras de validación de limpieza y una vez validada la técnica podríamos decir que se tendría un método robusto mediante el cual podremos obtener los resultados deseados, tales como buenos porcentajes de recobro en cada nivel muestreado, mediciones con alta repetibilidad y en un tiempo mucho menor al que se esperaría con técnicas convencionales.

Además que con el aumento en los gastos para el cuidado de la salud que afecta directamente el precio en las terapias, y esto haciendo presión sobre los márgenes de beneficio de las empresas que producen estas terapias, las compañías buscan medios innovadores de reducir sus gastos de producción y mejorar solo lo esencial.

La utilización de la Espectroscopia de Movilidad Iónica representa una gran disminución en tiempo de análisis, frente a la Cromatografía de Líquidos, debido a que con la EMI podemos obtener el resultado de un análisis en aproximadamente 30 segundos por muestra comparado con 15 a 30 minutos por muestra usando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, lo cual evidencia el potencial que representa al ser de 30 a 60 veces más rápida, ofreciendo una reducción de costos en el tiempo de espera de producción para las industrias farmacéuticas y por lo tanto mayores utilidades.

Por lo tanto mediante la reducción del tiempo de espera para la liberación de los equipos y el reducir el tiempo de análisis del laboratorio asociados con la limpieza, la **EMI** presenta ser una buena opción para aumentar de manera considerable la eficiencia económica en la fabricación y en la validación de la limpieza de la industria farmacéutica.

BIBLIOGRAFIA:

[1] FDA. Guide to inspections of Validation of Cleaning Processes;
http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074922.htm;
Última actualización 30 de Abril de 2009

[2] Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006;
http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SSA/Normas/Oficiales/2008/22122008(1).pdf;
Expedida el 22 de Diciembre de 2008

[3] James Agalloco, Frederick J. Carleton; Validation of Pharmaceutical Processes, Third Edition; Editorial Informa Healtcare USA, Inc. 58 Vanderbilt Avenue New York, NY 10017, Impreso en Los Estados Unidos de América en el 2008.

[4] Robert A. Nash; Pharmaceutical Process Validation Third Edition, revised and expanded; Editorial Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Av. NY 10016, Impreso en Los Estados Unidos de América en el 2003

[5] http://www.texwipe.com/products/family.asp
página visitada el 23 de Diciembre de 2009.

[6] James Agalloco and Associates, Will Brame, Bohdan Ferenc; Point to Consider for Cleaning Validation. PDA, Technical Report No. 29; 30 de Marzo de 1998.

[7] Reno Debono, Stephmen Stefanou, Matt Davis, and Gaurav Walia; Using Ion Movility Spectrometry for Cleaning Verification in Pharmaceutical Manufacturing. Magazine Pharmaceutical Technology – Articles, Publicado el 01 de Abril del 2002.

[8] Derek Brand, Xue-Song Li and Tim Wortley; Ion trap movility spectrometry-reducing downtime in cleaning validation and verification.
Innovations in Pharmaceutical Industry; Publicado el 19 de Abril de 2007
http://www.iptonline.com/articles/public/page100nonprint.pdf

[9] Derek Brand, Mei Guo, Dr. Ralf Wottrich and Tim Wortley; Direct Swabbing and Surface Recovery with Ion Trap Movility Spectrometry.
http://www.gesensing.com/products/resources/datasheets/GEsensing_whitepaperfinal.pdf