

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**



**Validación del procedimiento de limpieza de equipos en
el área de fabricación de líquidos en el Laboratorio
Farmacéutico Markos. Lima 2012.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

Bach. ROSALES ALTAMIRANO, LUIS ANTONIO

**AYACUCHO – PERÚ
2013**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

Acta de Sustentación de Tesis

R.D. N° 243-2013-FCB-D

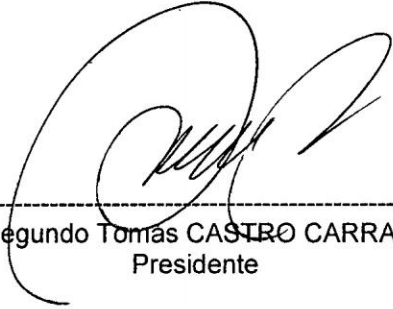
Bach. Luis Antonio ROSALES ALTAMIRANO

En la ciudad de Ayacucho a los doce días del mes de diciembre del año dos mil trece, siendo las cinco de la tarde, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, los miembros del Jurado Calificador bajo la presidencia del Dr. Segundo Tomás Castro Carranza (Memorándum N° 243-2013-UNSCH-FCB); con la asistencia de los miembros del jurado calificador Mg. Marco Rolando Aronés Jara, Mg. Edgar Cárdenas Landeo, Mg. Enrique Javier Aguilar Felices como cuarto jurado, Mg. Maricela López Sierralta (asesora), actuando como Secretario Docente Mg. Edgar Cárdenas Landeo, para recepcionar la sustentación de la tesis titulada: Validación del procedimiento de limpieza de equipos en el área de fabricación de líquidos en el Laboratorio Farmacéutico Markos, Lima 2012, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica Luis Antonio Rosales Altamirano, quien pretende obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico. El presidente del Jurado Calificador Dr. Segundo Tomás Castro Carranza inicia el acto de sustentación verificando la documentación en mesa y recomendando al sustentante inicie su exposición en el tiempo de cuarenticinco minutos.

Culminada la sustentación el señor presidente del Jurado Calificador solicitó la participación de los miembros del Jurado Calificador para realizar observaciones, aclaraciones y/o preguntas que crean por conveniente para realizar la calificación correspondiente, luego del cual el presidente solicita al sustentante y público en general que abandonen el auditorium dejando solos al jurado calificador para que puedan deliberar y evaluar, cuyo resultado es como sigue:

Jurado Calificador	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Dr. Segundo Tomás CASTRO CARRANZA	16,0	16,0	16,0
Mg. Marco Rolando ARONÉS JARA	18,0	18,0	18,0
Mg. Edgar CÁRDENAS LANDEO	17,0	17,0	17,0
Mg. Maricela LÓPEZ SIERRALTA	17,0	17,0	17,0
Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES	16,0	15,0	16,0
		Promedio final	17,0

De la evaluación realizada el sustentante obtuvo la nota promedio de DIESCISIETE (17); de la cual dan fé los miembros del Jurado Calificador, estampando su firma al pie en la presente acta, culmina el acto de sustentación a las siete y treinta de la noche.



Dr. Segundo Tomás CASTRO CARRANZA
Presidente



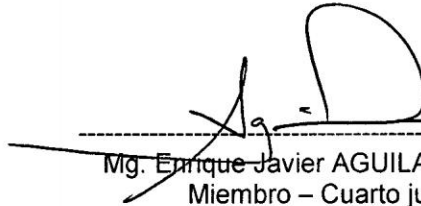
Mg. Marco Rolando ARONÉS JARA
Miembro



Mg. Édgar CÁRDENAS LANDEO
Miembro - Secretario



Mg. Maricela LÓPEZ SIERRALTA
Asesora



Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES
Miembro - Cuarto jurado

DEDICATORIA

A mi madre, Rosula Altamirano
Ccayanchira.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; por brindarme una formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica quienes contribuyeron con mi formación académica.

A mis asesores, por brindarme sus conocimientos y orientaciones que hicieron posible el desarrollo y culminación del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
INDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)	5
2.2.1. Aseguramiento de la calidad	5
2.2.2. Calidad	5
2.3. Validación	5
2.3.1. Etapas de la validación	6
2.4. Limpieza	7
2.4.1. Agentes de limpieza	7
2.4.2. Proceso de limpieza	7
2.4.3. Sistema de evaluación de limpieza	8
2.4.4. Tipos de muestreo	8
2.5. Establecimiento del límite de aceptación	10
2.6. Determinación de límites de aceptación	11
2.7. Validación de limpieza	12
2.7.1. Procedimiento de validación de limpieza	12
2.7.2. Protocolo de validación	13
2.8. Metodología aplicada al peor caso	15
2.8.1. Criterios de agrupación	15
2.8.2. Productos	15
2.8.3. Procedimientos	16
2.9. Criterios de selección del peor caso	16
2.10. Procedimiento de selección del peor caso	18
2.10.1. Criterios de selección	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23

3.1. Lugar de ejecución	23
3.2. Definición de la población y muestra	23
3.3. Equipos, materiales y reactivos	23
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	25
3.4.1. Selección del equipo prototipo	25
3.4.2. Selección del producto prototipo y activo a monitorear	25
3.4.3. Determinación de trazas del principio activo riboflavina 5 fosfato (producto prototipo)	25
3.4.4. Determinación de residuos del detergente	26
3.4.5. Determinación de la contaminación microbiana superficies	27
3.5. Límites de aceptación para los contaminantes	27
3.5.1. Límite de contaminación visual (contaminación física)	27
3.5.2. Límite de contaminación química del contaminante riboflavina 5 fosfato sódico	28
3.5.3. Determinación de los límites de limpieza	28
3.5.4. Límite de contaminación química del detergente	30
3.5.5. Límites de contaminación microbiológica	30
3.6. Desarrollo de la parte experimental	30
3.6.1. Muestreo con tres ciclos de limpieza radical	30
3.7. Análisis de datos	31
3.7.1. Cálculo del límite de detección y cuantificación	32
3.7.2. Determinación del porcentaje de recuperación	32
II. RESULTADOS	34
V. DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	52
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Casos de falla a las BPM	4
Tabla 2	Clasificación de solubilidad	17
Tabla 3	Clasificación de toxicidad	17
Tabla 4	Clasificación de menor dosis terapéutica	18
Tabla 5	Clasificación de mayor dosis diaria	18
Tabla 6	Lista de equipos versus productos	19
Tabla 7	Datos del equipo (reactor 1500 l)	19
Tabla 8	Lista de productos versus fórmula	20
Tabla 9	Datos de los insumos	20
Tabla 10	Matriz de solubilidad, toxicidad, dosis terapéutica, mayor dosis diaria, clasificación y producto	21
Tabla 11	Informe de equipos	24
Tabla 12	Clasificación del porcentaje de recuperación	32
Tabla 13	Valores del análisis de regresión lineal de soluciones de riboflavina 5 fosfato sódico en el rango 0,90 a 6,0 µg/ml. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	35
Tabla 14	Coefficiente de variación de los factores de respuesta. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	37
Tabla 15	Valores resultantes del límite de detección y cuantificación de riboflavina 5 fosfato sódico. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	38
Tabla 16	Cantidad de analito recuperado de riboflavina 5 fosfato sódico en una superficie similar al equipo mediante muestreo por hisopos. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	39
Tabla 17	Porcentaje de recuperación de riboflavina 5 fosfato sódico en función a la cantidad hallada y recuperada de analito. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	40
Tabla 18	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	41

Tabla 19	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	42
Tabla 20	pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	43
Tabla 21	Resultados de componentes de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	44
Tabla 22	Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	45
Tabla 23	Resultados de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Área bajo la curva en fracción de la concentración de soluciones de riboflavina 5 fosfato sódico en el rango de 0,90 µg/ml a 6,0 µg/ml. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	36
Figura 2	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página	
ANEXO 1	Proceso de validación de limpieza. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	58
ANEXO 2	Lista de equipos versus productos del área de líquidos. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	59
ANEXO 3	Lista de productos fabricados en el reactor de 1500 l incluidos en el grupo de validación versus tamaño de lote. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	60
ANEXO 4	Lista de producto versus fórmula. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	61
ANEXO 5	Datos de los insumos. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	63
ANEXO 6	Matriz de solubilidad, toxicidad, dosis terapéutica y mayor dosis diaria. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	65
ANEXO 7	Selección del peor caso de contaminación selección del producto prototipo. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	67
ANEXO 8	Datos de los productos fabricados en el equipo: reactor 1500 l y determinación de la cantidad máxima aceptable en el lote siguiente para cada contaminante. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	69
ANEXO 9	Datos de los productos fabricados en el equipo: reactor 1500 litros y determinación de la cantidad máxima aceptable en el lote siguiente para cada contaminante. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	72
ANEXO 10	Determinación de los límites de limpieza para cada contaminante de los productos fabricados en el reactor de 1500 l. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	74
ANEXO 11	Test de linealidad. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	76
ANEXO 12	Puntos de muestreo no probabilístico método hisopado. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	77

ANEXO 13	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	78
ANEXO 14	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	79
ANEXO 15	ph en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	80
ANEXO 16	Presencia de componentes de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	81
ANEXO 17	Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	82
ANEXO 18	Resultados de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	83
ANEXO 19	Trazas de Riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	84
ANEXO 20	Trazas de Riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	85
ANEXO 21	pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	86
ANEXO 22	Presencia de componentes de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	87
ANEXO 23	Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	88
ANEXO 24	Resultados de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	89

ANEXO 25	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	90
ANEXO 26	Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	91
ANEXO 27	pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	92
ANEXO 28	Presencia de componentes de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	93
ANEXO 29	Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	94
ANEXO 30	Resultados de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.	95
ANEXO 31	Matriz de consistencia	96

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue validar el procedimiento de limpieza aplicado a los equipos de fabricación en el Área de Líquidos del Laboratorio Farmacéutico Markos, durante los meses de enero a julio de 2012, en la ciudad de Lima. Esta investigación es de tipo básica descriptiva y de diseño transversal. La muestra que se usó en el trabajo de investigación fue un reactor de 1500 l, a fin de confirmar y documentar que los resultados obtenidos durante la aplicación de estos métodos son confiables. Se establecieron la identificación de los elementos de limpieza, la definición del alcance de la prueba y los límites aceptables para el contaminante riboflavina 5 fosfato sódico, aplicando procedimientos de muestreo y métodos de análisis establecidos bajo criterios de aceptación aplicados a los tres lotes consecutivos. La selección del producto se hizo aplicando la metodología del peor caso, donde se asume que si el equipo queda limpio en las condiciones más desfavorables también se limpiará en las condiciones más favorables. En los tres lotes analizados se hallaron trazas de riboflavina 5 fosfato sódico equivalentes a 1,843; 0,848 y 1,389 µg/hisopo, respectivamente, los mismos que se encuentran dentro de las especificaciones permitidas establecidos para su control (<17,12 µg/hisopo). Se concluye que el procedimiento de limpieza aplicado al equipo es confiable, lo que garantiza su uso sea cual sea el orden en el que se fabriquen los productos

Palabras clave: validación, procedimiento de limpieza, peor caso.

I. INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica mantener y alcanzar la calidad de los productos requiere de un programa de limpieza formal y consistente, para ello tenemos como propósito demostrar que con la aplicación del procedimiento de limpieza al reactor de 1500 l, se logrará reducir las trazas de activos, detergente y microorganismos que pueden generar contaminación al momento de la fabricación. Por lo tanto se considera viable porque se puede sustentar mediante métodos analíticos siguiendo un esquema establecido que abarca desde la implementación de un procedimiento de limpieza específico hasta la demostración estadística de que dicho procedimiento es eficaz.

La evolución de los conocimientos en el sector farmacéutico ha llevado a la introducción genérica de la validación de procedimientos de limpieza como requisito indispensable para asegurar la calidad de un producto, siendo así, ubicamos la validación de limpieza dentro de un sistema de garantía de calidad que nos permite demostrar con un alto grado de seguridad la fiabilidad que el siguiente lote 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 la reproducibilidad

del proceso de fabricación, reconociendo los puntos críticos y asegurando el mantenimiento del perfil cualitativo del producto final.

De acuerdo con el axioma de que “la calidad no se controla en un producto, la calidad se construye durante su fabricación”. La calidad del medicamento se consigue desde la limpieza de sus equipos de fabricación en todos y cada uno de los pasos de su proceso de producción, desde su investigación hasta el último análisis sobre el producto final. La garantía de la calidad de un producto deriva de una cuidadosa y sistemática atención a todos aquellos factores que puede influir en su calidad: limpieza de los equipos de fabricación, selección de sus componentes y materiales, diseño de producto y proceso, adecuado control estadístico del proceso. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Validar el procedimiento de limpieza aplicado a los equipos de fabricación del área de líquidos.

Objetivos Específicos:

- Determinar la ausencia de contaminantes de origen químico luego de aplicar el método de limpieza.
- Determinar la ausencia de contaminantes de origen físico luego de aplicar el método de limpieza.
- Determinar la ausencia de contaminantes de origen microbiológico luego de aplicar el método de limpieza.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La norma BPM plantea una meta, pero cada laboratorio determina las reglas que va a aplicar para lograr el objetivo y el método con el cual demostrará que efectivamente las cumple.

Por ejemplo, la norma BPM obliga a evitar la contaminación cruzada entre los diversos fármacos elaborados por un mismo equipo industrial. Cada laboratorio adopta sus propios procedimientos de limpieza cuando la máquina termina de fabricar un tipo de medicamento y antes de que empiece a elaborar otro. Sin embargo, debe ser capaz de demostrar que ese método de aseo efectivamente remueve todas las trazas. Para eso el laboratorio tiene que hacer análisis que comprueben el grado de limpieza obtenido. Y sólo cuando ese procedimiento muestre su validez, puede ser aplicado.

Lo mismo sucede con aspectos tan distintos como el control de calidad, la capacitación del personal o la calidad del agua utilizada para elaborar los jarabes. Cada laboratorio establece sus mecanismos de trabajo, pero tiene que demostrar con registros métodos y objetivos que ese mecanismo elegido funciona para el propósito que BPM exige.

Tabla 1. Casos de falla a las BPM.¹

Producto	Causa del Problema	Efecto del problema	Año	País
Tabletas de vitaminas y minerales pediátricas.	Contaminación cruzada con estrógenos por limpieza defectuosa del equipo.	Aparición de caracteres sexuales secundarios.	1958	EEUU
Tabletas de isoniazida para niños.	Contaminación con dietilestilbestrol por empleo de los mismos equipos para la manufactura y mala limpieza.	Aparición de caracteres secundarios en 8 niños menores de 6 años.	1962	EEUU
Tabletas de 0.25mg de digoxina.	Cambio de método de incorporación de digoxina.	Elevación de los niveles sanguíneos, intoxicación masiva, algunas muertes.	1965	EEUU
Ungüento oftálmico antiinfeccioso, contaminado con pseudomonas.	No se preservó el producto pues no se consideró necesario por llevar dos antibióticos de amplio espectro y un esteroide y además por contener un bajo porcentaje de agua.	Un paciente perdió la vista y otros sufrieron graves lesiones en los ojos que comprometieron seriamente la visión.	1968	Europa
Solución de hexaclorofeno para lavado de recién nacidos.	La solución empleada en la unidad de neonatos de uno de los centros hospitalarios más grandes contenía miles de microorganismos especialmente Serratias y Pseudomonas.	Estado crítico de 13 recién nacidos infectados con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	1968	EEUU
Solución humedecedora para lentes de contacto.	Manufactura en condiciones inadecuadas y por personal no preparado para esta actividad.	Brote de conjuntivitis hemorrágica en más de 40 usuarios.	1988	Europa
Soluciones dextrosalinas de gran volumen.	Malas condiciones sanitarias del laboratorio fabricante y deficiente procedimiento de manufactura. Malos procedimientos de manufactura controles inexistentes, equipos y procedimientos no validados.	Varios pacientes muertos en un centro hospitalario. Devoluciones del producto y quejas presentadas ante las autoridades sanitarias por los centros hospitalarios de la región.	1990	Colombia
Jarabe de acetaminofén.	Reemplazo en el sistema solvente de la glicerina por etilenglicol.	36 niños en grave estado de intoxicación, de 64 casos reportados.	1996	República Dominicana

2.2. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Dentro del concepto de garantía de la calidad, las buenas prácticas de manufactura constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada. Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las BPM y deben de efectuarse conforme a los protocolos definidos, deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base de un estudio de validación. Tal como lo refiere el Título primero; Capítulo IV artículo 10, Capítulo V artículo 11, Capítulo XII artículo 113 al 123.²

2.2.1. Aseguramiento de la calidad

En la industria farmacéutica aseguramiento de la calidad involucra acciones y medidas sistemáticas para asegurar la confianza suficiente en que el producto satisface determinadas condiciones de calidad (monitoreo, autoinspecciones, validaciones, control inspectivo, etc.). Para poder alcanzar los objetivos de calidad es necesario el compromiso de los diversos departamentos de la organización.

El sistema de garantía de calidad en la industria farmacéutica debe asegurar entre otras cosas que los productos farmacéuticos estén diseñados, elaborados de tal forma que se tengan en cuenta los requisitos de BPM y otros códigos como buenas prácticas de laboratorio.³

2.2.2. Calidad

Según la International Organization for Standardization (ISO), el concepto de calidad se refiere al grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos.⁴

2.3. Validación

La administración para Alimentos y Drogas de los EE.UU. de Norteamérica (FDA) define la validación como el establecimiento de evidencia documentada que proporcione un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico

generara consistentemente que un producto cumpla con sus especificaciones predeterminadas y sus atributos de calidad.⁵

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define la validación como el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado a de efectuarse uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados.⁶

La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) define la validación como la planificación, ejecución, verificación y documentación de un plan asegura que un equipo, procedimiento, proceso, actividad o servicio, cumple con las especificaciones establecidas previamente y lo hace de forma reproducible y homogénea a lo largo del tiempo.⁷

La documentación de la validación es una parte fundamental, ya que la validación es elaborar una evidencia documentada de la calidad de los productos fabricados.⁸

Los principales beneficios de la validación son: prevenir las desviaciones del proceso productivo, optimizar el uso de equipos y personal en procesos críticos, facilitar el planeamiento y control de la producción y verificar la capacidad del proceso.⁹ Siendo aplicable a procesos, equipos, materiales, actividades o sistemas.² Dentro de un laboratorio de análisis se debe considerar la validación de maquinaria y equipos, validación de métodos de limpieza, validación de procesos de fabricación, validación de métodos analíticos. Con la validación se logra el aseguramiento de la calidad, reducción de costo, aumento de productividad, cumplimiento de regulaciones normas y optimización de proceso.¹⁰

2.3.1. Etapas de la validación

a. Calificación de diseño (DQ): Verificación documentada de que las instalaciones, servicios de apoyo, equipos y procesos han sido diseñadas de

acuerdo a los requisitos de las BPM.^{11,12}

b. Calificación de instalación (IQ): Establecer evidencia documentada que el equipo de proceso y los sistemas auxiliares son capaces constantemente del funcionamiento dentro de límites y de tolerancias establecidos.¹¹

c. Calificación de operación (OQ): Verificación documentada de que el sistema o subsistema opera de la manera esperada en todos los rangos de operación esperados.¹²

2.4. Limpieza

Consiste en eliminar la suciedad y cualquier residuo indeseable de origen físico, químico o microbiológico sin alterar la superficie a limpiar.¹³ En la industria farmacéutica significa eliminación de todos los residuos correspondientes a un lote previo de producción antes de iniciar un nuevo lote de producto. El residuo puede contaminar o interferir en el procedimiento del siguiente producto.¹⁴

2.4.1. Agentes de limpieza

Para eliminar residuos adheridos se emplean agentes de limpieza, los cuales en la Industria Farmacéutica contienen sólo sustancias con valores dosis letal (DL)₅₀ no críticos. Es importante conocer tanto el proceso de fabricación, como la fórmula cuali – cuantitativa del producto que se fabrica para elegir los agentes de limpieza que requiere dicho proceso. Lo anterior lleva a establecer el método de limpieza, método de muestreo y la metodología analítica para la determinación de los residuos. Los agentes de limpieza son productos que se usan en las etapas de prelavado, lavado y enjuague final.¹⁴

2.4.2. Proceso de limpieza

Cada empresa basada en sus políticas internas debe analizar y definir la forma de efectuarlo de manera eficiente, para lo cual se debe considerar el diseño del equipo, procesos asépticos y no asépticos, y las diferentes áreas de fabricación. Deben conocer perfectamente con qué tipo de excipientes y activos están

trabajando; el área del surtido debe tener su propio procedimiento general de limpieza, y en aquellos casos en que los laboratorios manejen productos como psicotrópicos, hormonales, antibióticos, oncológicos, biológicos, penicilínicos, etc., debe tener procedimientos de limpieza de acuerdo a sus necesidades. Es recomendable que los procesos de limpieza se desarrollen paralelamente durante el desarrollo del producto (escala piloto). La limpieza de los equipos de producción debe hacerse siguiendo un procedimiento estándar de operación donde se detallen los pasos a seguir durante el lavado, prelavado y enjuague del equipo.^{15,16}

2.4.3. Sistema de evaluación 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.

En el caso de los procesos de limpieza, el objetivo es que el siguiente lote de producto fabricado no sea contaminado por cualquier fuente ya sea química o microbiológica.¹⁷ 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.¹²

2.4.4. Tipos de muestreo

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, que es parte integral de la validación del método.¹²

a. Muestreo con hisopo o por raspado de superficie

Las muestras son tomadas al azar en un área definida que este en contacto con el producto. Los hisopos utilizados para este fin deben tener la característica de estar preparados con materiales inertes que no genere interferencias con el residuo.¹⁸

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.¹⁹

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 difícil limpieza tales como: costuras de los equipos, empaques, piezas móviles en general. Una ventaja importante que presenta este tipo de muestreo es que aquellos activos que son insolubles en el agua por ejemplo, pueden ser muestreados de esta forma, ejerciendo una acción mecánica y por arrastre lograr el recobro de los mismos. Tras el muestreo limpiar las zonas en las que se realizó el contacto para evitar crear un foco de contaminación.²⁰

Este procedimiento tiene la ventaja de ser muy simple. Pero una posible desventaja es la dificultad, de controlar el área a ser hisopada. La recuperación de los residuos de las superficies es limitada.¹⁹

b. 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 a cantidad de residuos de unos compuestos específicos, 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. Una

ventaja de este tipo de muestreo es que se pueda 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. Además los residuos o contaminantes puede no ser soluble y quedar en el equipo, el método es sencillo pero no permite evaluar residuos insolubles.^{21,22}

2.5. Establecimiento del límite de aceptación

En un estudio de validación de limpieza, se debe demostrar que el método empleado para la limpieza del equipo reduce los contaminantes debajo de los límites aceptables.²³ Estos límites de aceptación deben ser calculados considerando una serie de factores como dosis de principio activo, toxicidad, tamaño de lote, etc.^{22,7} Si tras la fabricación del producto A se efectúa una limpieza y se fabrica el producto B, la cantidad límite de contaminante que se transfiere al producto B debe cumplir con uno o más criterios de aceptación.⁷

Se considera una lista de todos los productos que son fabricados y para cada producto el tamaño de lote, número de unidades por dosis por lote, potencia más baja, dosis máxima diaria y área superficial de contacto del producto en cada pieza del equipo en cada fabricación.

Es muy importante que el criterio de establecimiento de límites de aceptación incluya el uso de áreas acumuladas en la fabricación, ya que una fabricación normal incluye varias etapas varios equipos utilizados. La elección de la fórmula para calcular criterios de aceptación depende de que tan estricto se quiera ser, de la política de limpieza de la compañía o incluso del método analítico que se va a utilizar para evaluar la limpieza.²³ El criterio de la detección analítica no es

considerado adecuado ya que si existen niveles de contaminación o residuos que no son detectados, esto no significa que no hay contaminación residual presente después de la limpieza, esto sólo significa que no existe nivel de contaminación mayor que la sensibilidad o límite de detección del método analítico en la muestra.

Antes de calcular los criterios de aceptación también es necesario contar con información sobre área superficial individual de los equipos y los productos que entran en contacto con cada uno de los equipos de fabricación.

2.6. Determinación de límites de aceptación

- a. Individual: Es decir, calcular un criterio de aceptación por producto tomando el área total de los equipos con lo que tuvo contacto en todo el proceso de fabricación.
- b. Calcular el criterio eligiendo el peor de los casos de productos fabricados en un solo equipo: La elección del peor de los casos puede ser el principio activo más tóxico (LD50), menos soluble en agua o más difícil de limpiar (criterio visual)

En general, en el peor de los casos lo correcto es adoptar un procedimiento de limpieza que este validado para detectar activos menos solubles o productos finales así como los residuos de agentes de limpieza, si estos dejan residuos.

El juicio más usado en el monitoreo de estos contaminantes es estimar en el peor de los casos la más alta concentración permitida en el siguiente producto.

Cuando más de una pieza del equipo o área o fase se involucra en el proceso de limpieza, el efecto acumulativo de cada uno puede tomarse en consideración.

La elección de la fórmula para calcular criterios de aceptación va a depender de que tan estricto se quiera ser, de la política de limpieza de la compañía o incluso del método de muestreo o el método analítico que se va utilizar para evaluar la limpieza.²²

2.7. Validación de limpieza

La validación de limpieza en el contexto de industria farmacéutica se define como la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un proceso, equipo, material, actividades o sistema es lo suficiente confiable como para producir un resultado previsto.¹² Es necesario validar los procedimientos de limpieza por las siguientes razones:

- a. Garantiza que el método de limpieza disminuye el riesgo de contaminación cruzada entre productos diferentes que son procesados en un mismo equipo.
- b. Disminuir el riesgo de contaminación ya sea microbiana o por restos de materiales de limpieza en los productos.²⁴
- c. Dentro del sistema de aseguramiento de la calidad, la validación es parte esencial de las Buenas Prácticas de Manufactura.
- d. La validación de métodos de limpieza como parte de las BPM es regulada y exigida por DIGEMID y por normas internacionales de la OMS, FDA.

2.7.1. Procedimiento de validación de limpieza

Se debe elaborar el procedimiento de limpieza, considerando que es vital el diseño del equipo en la evaluación.

Si un procedimiento de limpieza es adecuado para un número de productos, entonces sólo es necesario un POE para estos productos.

Los procedimientos de limpieza deben ser lo suficientemente detallados para eliminar la posibilidad de inconsistencias durante el proceso de limpieza.

A. Parámetros del equipo a ser evaluados:

- Identificación del equipo a ser limpiado
- Dificultad de limpieza en las áreas
- Propiedad de los materiales
- Facilidad de desensamblaje

- B. Residuos a ser limpiados
 - Límites de limpieza
 - Solubilidad de los residuos
- C. Agentes de Limpieza y parámetros a ser evaluados
 - Limpieza manual
 - Tiempos y secuencias
 - Volúmenes
- D. Otros requerimientos

La documentación de la validación debe incluir:

- Detallar los métodos de limpieza
- Inspeccionar y verificar el equipo limpio

2.7.2. Protocolo de validación

En el protocolo de validación es necesario definir ítems y actividades específicas que constituyen un estudio de validación de limpieza. Se elabora un plan maestro de validación indicando la estrategia para un rango de productos/ tipo de equipos.²⁵ El protocolo debe ser elaborado antes de iniciar el estudio y debe incluir lo siguiente:

a. El objetivo del estudio

Se define la finalidad de la validación (indicar el producto a ser removido y el equipo del cual será removido). Indicar el grupo de productos si el estudio es realizado para demostrar la aceptabilidad del procedimiento de limpieza para un grupo de productos. En el procedimiento de limpieza a ser validado debe señalarse los agentes de limpieza, tiempos, ciclos de limpieza.

b. Alcances del estudio

El equipo de validaciones debe evaluar los procedimientos y determinar que residuos serán monitoreados y cuáles no, en base a un sustento científico racional.

Una vez definido el producto a monitorear debe definirse que residuos (incluidos agentes de limpieza) serán muestreados.

- **Lista de los parámetros del proceso a ser verificados**

Es necesario particularmente cuando se emplean métodos de limpieza manual, automáticos y semiautomáticos.

- **Muestreo e inspección del procedimiento a ser usado**

Se define el tipo de muestreo a ser usado y cuantas muestras se tomarán.

Se adjuntará un diagrama indicando los puntos de muestreo.

- **Personal responsable durante el estudio**

- **Métodos analíticos a ser usados: (referencias)**

- **Criterios de aceptación**

- a. Físicos
- b. Químicos

- **Control de cambios**

- **Aprobación del protocolo antes del estudio**

- c. Reporte de Validación**

En el reporte de validación es necesario presentar los resultados y conclusiones para asegurar la aprobación del estudio. El reporte debe incluir lo siguiente:

- a. Resumen o referencia del procedimiento usado para la limpieza, las muestras y las pruebas.
- b. Resultados de los análisis de las muestras.
- c. Conclusiones con respecto a la aceptabilidad de los resultados, y el estado del procedimiento validado.
- d. Recomendaciones en base a los resultados o información relevante obtenida durante el estudio incluyendo la revalidación si ésta es aplicable.

- e. Conclusión final
- f. Revisión de las desviaciones ocurridas sobre el protocolo inicial.

2.8. Metodología aplicada al peor caso

Se asume que si el equipo queda limpio en las condiciones más desfavorables también se limpiará en las condiciones más favorables. El peor caso seleccionado deberá llevar la prioridad en el programa de validación.^{7,19}

2.8.1. Criterios de agrupación

Los productos fabricados en un mismo equipo son agrupados de acuerdo a aquellos que son limpiados con el mismo procedimiento de limpieza (mismo agente de limpieza, concentración, temperaturas, tiempos, etc.) y se selecciona el “peor caso” para la validación en cada grupo. El peor caso seleccionado deberá llevar la prioridad en el programa de validación, y la validación del peor caso concluirá demostrando la efectividad del método de limpieza para todos los productos dentro del grupo, incluidos aquellos que no son analizados individualmente.^{7,19}

2.8.2. Productos

Según la diversidad de productos fabricados en una planta se pueden dar los siguientes casos:

- Productos que se fabrican en un mismo equipo con igual método de limpieza
- Productos que se fabrican en el mismo equipo con diferente método de limpieza
- Productos que se fabrican en el mismo equipo con dosis terapéuticas muy bajas, pequeños tamaños de lote.
- Productos tóxicos y no tóxicos que se fabrican en el mismo
- Productos con alta y baja solubilidad que se fabrican en el mismo equipo

2.8.3. Procedimientos

Para un equipo en el que se fabrican varios productos, se requiere de un procedimiento de operación estándar que cubra las demandas de limpieza de los productos en él asegurando la remoción de todos los contaminantes. El criterio para definir procedimientos de limpieza es el de agrupar por productos según la similitud de sus propiedades (solubilidad en agua) y establecer el procedimiento de limpieza general para productos de un mismo grupo (con un miembro del grupo el cual es el peor caso). Con lo que también se disminuirían los estudios de validación.

2.9. Criterios de selección del peor caso

Para seleccionar el peor caso dentro de un grupo de productos se realizan investigaciones ya sean bibliográficas o en base a la experiencia de trabajo en una planta de producción.

Los criterios según los cuales se selecciona el peor caso son:

- a. Solubilidad
- b. Toxicidad
- c. Dosis terapéutica
- d. Mayor dosis diaria

a. Solubilidad

Se realiza en base a datos de solubilidad de las sustancias en el solvente usado para la limpieza, como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de solubilidad.²⁸

Términos de descripción	Partes de solvente en volumen por una parte de soluto en peso	Clasificación
Muy soluble	No más de una parte	1
Libremente soluble	De uno a 10 partes	
Miscible		
Soluble	De 10 a 30 partes	2
Poco soluble	De 30 a 100 partes	
Parcialmente soluble		
Ligeramente soluble	De 100 a 1 000 partes	3
Muy ligeramente soluble	De 1000 a 10 000 partes	4
Prácticamente insoluble	Más de 10 000 partes	5
Insoluble	N/A	
Inmiscible		

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

b. Toxicidad

La evaluación incluye clasificación de sustancias tóxicas y no tóxicas.²⁷

Los grupos son presentados como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de toxicidad.²⁸

Términos de descripción	DL ₅₀ , g/kg (oral, ratas)	Clasificación
No Tóxico	≥ 1, 678	1
Tóxico	0,168 – 1,677	2
Altamente tóxico	0,011 – 0,167	3
Extremadamente tóxico	0,0011 – 0,010	4
Súper tóxico	≤ 0,001	5

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

c. Dosis terapéutica

Según este criterio se agrupan los productos de acuerdo a la menor dosis

terapéutica por vía de administración. En los casos donde la dosis terapéutica es desconocida como es el caso de productos es fase de desarrollo, o productos de degradación, excipientes se usan los datos de toxicidad, se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de menor dosis terapéutica.²⁸

Grupo	Intervalos de dosis (menor dosis terapéutica)
1	> 1,000 g
2	0,100 – 1,000 g
3	0,010 – 0,099 g
4	0,001 – 0,009 g
5	< 0,001 g

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

d. Mayor dosis diaria

Según este criterio se agrupan los productos de acuerdo a la mayor dosis diaria consumida como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de mayor dosis diaria.²⁸

Intervalos de dosis (mayor dosis diaria mg)	Clasificación
Excipientes	1
cero – 499	1
500 – 1999	2
2000 – 2999	3
3000 – 3999	4
≥4000	5

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

2.10. Procedimiento de selección del peor caso

- Hacer un listado de equipos versus productos para establecer los productos que utilizan un equipo en común y poder realizar la validación por equipo.

En el caso de que varios productos utilicen los mismos equipos se procederá a realizar la validación como tren de equipos, como se indica en el Anexo 2

Tabla 6. Lista de equipos versus productos.

EQUIPO \ PRODUCTO	PRODUCTO 1	PRODUCTO 2
EQUIPO 1		
EQUIPO 2		

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

- Se establece un cuadro resumen indicando los productos fabricados por equipo versus el tamaño de lote, como se indica en el anexo 3.
- Si se opta por la validación de equipos en forma individual especificar el POE de limpieza y su código correspondiente.

En el caso de una validación de un tren de equipos hacer un cuadro del tren de equipos con sus respectivos códigos.

Tabla 7. Datos del equipo (reactor 1500 l)

Código	Descripción	Marca	Protocolo de calificación	Informe técnico de calificación
20.002	Reactor 1500 L	SEW	PCI-PR-05	ITCI-PR-05
			PCO-PR-05	ITCO-PR-05
			PCD-PR-05	ITCD-PR-05

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

De los productos fabricados en el mismo equipo o tren de equipos se establece el peor caso.

- Establecer un cuadro de productos versus los insumos de la fórmula de cada producto (principios activos y excipientes), el tamaño de lote en litros y el peso por unidad de dosis en mg, como se indica en el Anexo 4 y 5.

Tabla 8. Lista de productos versus fórmula.

Producto	Tamaño de lote	Peso promedio x unidad de dosis (mg)	Insumo 1	Insumo 2	Insumo 3
Producto 1					
Producto 2					
Producto 3					

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

- Hacer un cuadro introduciendo los datos de los insumos clasificando numéricamente solubilidad, toxicidad LD₅₀ u otra, dosis terapéutica y mayor dosis diaria para hallar la clasificación combinada de cada insumo según los cuadros:

Tabla 9. Datos de los insumos

Insumo	Solubilidad	Clasific- Solubilidad	Toxicidad DL ₅₀	Clasific. toxicidad	Dosis terapéutica	Clasific. Dosis t.	Mayor dosis diaria	Clasific. Mayor Dosis
Insumo 1								
Insumo 2								
Insumo 3								

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

- Hacer una matriz resumen con los datos de la clasificación obtenida por cada insumo según la tabla anterior para hallar la clasificación combinada que resulta de la suma de las clasificaciones obtenidas según los cuadros detallados, como se indica en el Anexo 6.

Tabla 10. Matriz de solubilidad, toxicidad, dosis terapéutica, mayor dosis diaria, clasificación y producto

Insumo	Solubilidad	Toxicidad DL ₅₀	Dosis	Mayor dosis diaria	Clasificación combinada	Producto
Insumo 1						
Insumo 2						
Insumo 3						

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

2.10.1. Criterios de selección

- De todos los insumos que forman parte de los productos fabricados en el tren de equipos o en el equipo en estudio se elige como peor caso a ser monitoreado para el método de limpieza, el que tenga el mayor valor en la matriz de solubilidad, toxicidad, dosis terapéutica y mayor dosis diaria, como se indica en el Anexo 7.
- Del insumo elegido como peor caso se elige el producto en base al cual se realizarán los estudios, como se indica en Anexo 8.
- Si más de un producto cumple este criterio, entonces se elegirá el que pertenezca al mayor tamaño del lote A.
- De los productos incluidos en el estudio se elige como lote B el menor tamaño de lote; si se diera el caso de que más de un producto tuviera un tamaño de lote similar se agrupan éstos y se elige el producto con mayor puntaje en el cuadro de clasificación del peor caso.
- En caso de que el producto elegido como el peor caso, producto con la mayor prioridad para la validación no sea regularmente fabricado, entonces el producto con la siguiente mayor prioridad será el monitoreado.
- La sustancia con la mayor prioridad debe ser analizada en la primera ocasión posible.
- Si más de una sustancia cumple estos criterios, entonces se elegirá la

sustancia que en base a la experiencia de trabajo es la más difícil de limpiar ya sea por persistencia de colores u olores.

- Se anexará en el protocolo de validación los criterios que se tomaron para la selección del peor caso y se especificará los productos para los cuales el método de limpieza es válido.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de Investigación se llevó a cabo en los Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A, durante los meses de Enero a Julio 2012.

3.2. Definición de la población y muestra

Población: Equipos de fabricación del área de líquidos no estériles del Laboratorio Farmacéuticos Markos S.A

Muestra: Reactor de 1500 l, al que se aplicó previamente el método de limpieza respectiva.

3.3. Equipos, materiales y reactivos

A. Equipos

El instrumental empleado en la validación de limpieza fue el siguiente:

- HPLC
- Balanza Analítica
- Baño María
- Estufa
- Potenciómetro
- Autoclave
- Contador de colonias

- Refrigerador
- Incubadoras
- Vortex

Tabla 11. Informe de equipos

Descripción	Marca	Modelo	Serie	Informe técnico de calificación
Balanza Analítica	Mettler	AE160	---	ITCI-CC.006
				ITCO-CC.006
				ITCD-CC.006
Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC	Agilent	1100	---	ITCI-CC.004
				ITCO-CC.004
				ITCD-CC.004
Ultrasonido	Branson	5210	---	ITCI-CC.002
				ITCO-CC.002
				ITCD-CC.002

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A

B. Materiales

Fiolas de 500, 200, 50 y 10 ml; pipetas volumétricas de 10, 5, 3, 1 ml matraz de 1000 ml; membranas filtrantes de nylon (0,45 μm x 25 mm); membranas filtrantes de nylon (0,45 μm x 47 mm); porta filtros jeringas descartables, viales para inyección x dos ml, columna cromatográfica Chromolith® Performance 100x4, 6mm RP-18e

C. Reactivos

- Hexansulfonato de sodio 0,06 M
- Trietilamina
- Ácido Acético glacial
- Metanol grado HPLC
- Agua destilada
- Riboflavina 5-fosfato sódico estándar de referencia

3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1. Selección del equipo prototipo

El equipo prototipo fue aquel seleccionado como el peor caso de un grupo de equipos, como se indica en el Anexo 2.

3.4.2. Selección del producto prototipo y activo a monitorear

El producto prototipo es el producto seleccionado como el peor caso de un grupo de productos, el cual fue monitoreado en tres lotes consecutivos.

Para seleccionar el peor caso se realizaron investigaciones bibliográficas, experiencias de trabajo en el área de fabricación de líquidos, como se indica en los Anexos 4, 5, 6, 7 y 8.

3.4.3. Determinación de trazas del principio activo riboflavina 5 fosfato (producto prototipo)

a. Método de análisis

Se usó la metodología analítica de determinación de riboflavina 5 fosfato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), validada en cuanto a especificidad y selectividad, linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad por el Comité de Validación de Laboratorio.

b. Preparación de las soluciones de trabajo

Estándar de referencia: Se pesó aproximadamente 30mg de riboflavina 5 fosfato sódico, se llevó a una fiola de 100ml, disolvió, enrasó con agua y homogenizó. De esta solución se midió 10ml en una fiola de 100ml. La concentración obtenida fue de 30µg/ml.

Se hicieron las diluciones respectivas al 3 % (0,9 µg/ml), 5 % (1,5 µg/ml), 10 % (3,0 µg/ml), 15 % (4,5 µg/ml) y 20 % (6,0 µg/ml) con agua. Se homogenizaron las soluciones preparadas, fueron filtradas a través de membrana de 0,45 µm de poro e inyectadas por triplicado.

Se analizaron por triplicado 5 soluciones patrón de riboflavina-5-fosfato a

concentraciones crecientes de 3, 5, 10, 15 y 20 %. Se determinó la pendiente b a partir de la ecuación de la recta de regresión: $Y = bX + a$, tomando como X la concentración y como Y las respuestas. Como se indica en la tabla 13 y figura 1. El límite de detección y cuantificación del riboflavina -5- fosfato sódico se determinaron a partir de la curva de regresión considerando concentraciones bajas del analito por extrapolación a concentración cero. Como se indica en la tabla 15.

A. Criterios de aceptación

Los límites de detección de trazas se basaron en uno de los siguientes criterios:

El criterio organoléptico señala que el contaminante no debe detectarse en un examen visual (Se puede detectar 4 – 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Se considera aceptable un límite de 1 – 10 ppm. En el caso de contaminantes muy activos se consideran límites de 1- 100 veces más bajos.

Fracción de dosis terapéutica

La cantidad debe ser inferior a una fracción determinada de la dosis terapéutica. Mínima del contaminante. Se considera una fracción de 10 % + factor de seguridad de 10 = 0,01.

3.4.4. Determinación de residuos del detergente

a. Pruebas fisicoquímicas

Determinación de pH: se determinó el pH del agua de enjuague con un potenciómetro calibrado previamente.

b. Identificación de los componentes del detergente

- **Sulfato de sodio:** En un tubo de prueba añadir cinco ml de agua de enjuague, añadir dos ml de solución de acetato de plomo, la formación de un precipitado blanco indica la presencia de sulfato de sodio.
- **Tripolifosfato de sodio:** En un tubo de prueba añadir cinco ml de agua de

enjuague, añadir albúmina y uno ml de ácido acético. La coagulación indica presencia de tripolifosfato de sodio.

- **Lauril sulfato de sodio:** Agitar el tubo de prueba que contiene cinco ml de agua de enjuague, la formación de espuma constante indica la presencia de lauril sulfato de sodio.

c. Criterios de aceptación

El método de limpieza será considerado válido si en los resultados de los tres lotes consecutivos del producto en evaluación hay ausencia de los componentes del detergente y el pH del agua que ingresa a la máquina para el enjuague sea $\pm 0,02$ al pH del agua que sale después del tercer enjuague.

3.4.5. Determinación de la contaminación microbiana superficies

En el área de microbiología se procedió a sembrar por el método de incorporación en el medio nutritivo Agar tripticasa soya.

Se incuba la placa invertida a $35^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas para recuento de mesófilos aerobios viables y se incuba a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por cinco a siete días para recuento de hongos y levaduras.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procede a realizar el recuento de las ufc. Se realizan los cálculos y expresan los resultados en ufc/cm².

Se realizó el análisis microbiológico del agua de enjuague: recuento microbiano y descarte de la presencia de coliformes y microorganismos patógenos. Según la técnica de análisis de aguas de la USP 31. El ensayo se hizo por triplicado y se expresan como ufc/ml.

3.5. Límites de aceptación para los contaminantes

3.5.1. Límite de contaminación visual (contaminación física)

Ausencia de contaminación visible. Según el tipo de residuo la sensibilidad de una determinación visual oscila entre cuatro - 20 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

3.5.2. Límite de contaminación química del contaminante riboflavina 5 fosfato sódico

Los datos de los productos fabricados en el reactor de 1500 l como se indica en los Anexos 2, 3, 4, 5 y 6.

a. Datos del Producto A: Vitaveran NF B12 Jarabe. Como se indica en los Anexos 7 y 8.

- Dosis Terapéutica mínima del lote A (LTUD70 A) en mg: 0,5 mg

b. Datos del Producto B (siguiente lote) Peor caso de contaminación, como se indica en el Anexo 8.

- Menor tamaño de lote (g): 400 l
- Dosis Terapéutica Máxima por unidad de producto B (g) (MTUDB): 6,000 g

c. Datos del equipo

- Área total de la superficie del equipo en contacto con el producto: 35785,024 cm²
- Área de muestreo por hisopado 25 cm²
- Cantidad de agua utilizada para el enjuague: 20 l

3.5.3. Determinación de los límites de limpieza

a. Cálculo del límite de limpieza en un área de muestreo

$$LL_{\mu\text{g}/\text{hisopo}} = MSCR_A \times L \times 1000$$

Dónde:

LL : Límite de limpieza en μg o $\mu\text{g}/\text{hisopo}$

$MSCR_A$: Máxima concentración de residuo sobre la superficie del equipo expresado en mg/cm^2

L : Superficie de muestreo expresado en cm^2

b. Cálculo del límite de limpieza expresado en partes por millón (ppm)

Si el hisopo ha sido sumergido en un volumen determinado de solución para

recuperar el principio activo se aplica la siguiente fórmula:

$$LL_{ppm} = \frac{LL_{\mu g / hisopo}}{V_{(ml)}}$$

Donde:

$LL_{\mu g / hisopo}$: Límite de limpieza en $\mu g / hisopo$

LL_{ppm} : Límite de limpieza en ppm

V : Volumen utilizado para recuperar el principio activo del hisopo

- En caso de que una sustancia tenga un límite de limpieza muy bajo en comparación a los demás contaminantes, se recomienda validarlo por separado, el límite fijado debe ser práctico, alcanzable y justificable.
- El límite de limpieza determinado corresponde al límite establecido usando toda el área de contacto de un tren de equipos, sin embargo el criterio utilizado para la validación de limpieza está basado en el concepto de equipos independientes lo que conlleva a una mayor flexibilidad en la validación.
- Consecuentemente el límite establecido por equipo resulta de la interpolación del límite de limpieza encontrado frente a la superficie de contacto del equipo para lo que se aplica la siguiente fórmula:

$$LL_{equipo} = \frac{LL_{\mu g / hisopo} \times S_{equipo}}{SA} \times 100$$

Dónde:

$LL_{\mu g / hisopo}$: Límite de limpieza en $\mu g / hisopo$

LL_{equipo} : Límite de limpieza por equipo en $\mu g / hisopo$

S_{equipo} : Superficie del equipo en cm^2

SA: Superficie total del tren de equipos en cm^2

Se determinó el límite de limpieza usando los criterios de dosis terapéutica y toxicidad y se obtuvo el límite más estricto, como se indica en los Anexos 9 y 10.

El cálculo del límite de limpieza para las superficies: 17,12 $\mu g / hisopo$ (límite más

- Toma de muestras por enjuague de la superficie interior del equipo para análisis fisicoquímico y microbiológico aproximadamente 2 l.
- Toma de muestras del agua de lavado para determinación de residuos de detergentes aproximadamente 2 l.
- Toma de muestras de superficies según puntos de muestreo no probabilístico, como se indica en el anexo 13 para la determinación del contaminante riboflavina 5 fosfato sódico.
- Control microbiológico del ambiente, exponer cuatro placas por área A,B,C,D
- Realización de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos correspondientes a los muestreos anteriores.
- Realización de los cálculos pertinentes.

B. Segundo y tercer ciclo

La secuencia anterior se repite dos veces más.

El plan escrito donde establecemos los aspectos que se tomaron en cuenta para realizar la validación de limpieza se detallan en el protocolo de validación de limpieza.

3.7. Análisis de datos

El análisis estadístico de datos se realizó para calcular la cantidad de residuos de principio activo en el equipo, se promedió las dos corridas correspondientes a las muestras y se sumaron tres desviaciones estándar (PROM + 3 DS), a partir de este dato se calculó según las fórmulas la cantidad de residuo en el equipo. En base a pruebas de límite de confianza y análisis de varianza a un nivel de significancia del 95 por ciento para determinar el límite de detección y cuantificación. Estos resultados junto a los obtenidos en los análisis de trazas de detergentes y microbiológicos se presentaron en tablas

3.7.1. Cálculo del límite de detección y cuantificación

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

- Se obtuvo otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, a concentraciones de 0,3; 0,9 y 1,5 µg/ml, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapoló la respuesta a concentración cero (Y_{bl}).
- Se determinó la desviación estándar (S) de cada concentración de la nueva curva de calibración.
- Se efectuó el análisis de regresión tomando como X a la concentración y la desviación estándar como Y.
- Se extrapoló la desviación estándar del blanco.

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

3.7.2. Determinación del porcentaje de recuperación

Se determinó el porcentaje de recuperación del método de muestreo en combinación con el método analítico. Siendo el valor de R superior al 50 %.

El uso del factor de corrección para los estudios de recuperación se realizó según la siguiente tabla.

Tabla 12. Clasificación del porcentaje de recuperación

Recuperación (%)	Factor de corrección
≤ 50	Método no adecuado
$> 50 \leq 89$	Requerido
$\geq 90 \leq 100$	No Requerido
$\geq 111 \leq 150$	Requerido
≥ 150	Método no adecuado

- Se preparó una solución de concentración 50 µg/ml.
- Se tomó 100 µl y “ensuciar” 25 cm² de una superficie similar al equipo, se dejó secar.
- Se realizó el muestreo de la superficie y reposó por 30 minutos, se sonicó por 10 minutos y agitó con ayuda del vórtex por un minuto.
- Se filtraron las muestras e inyectaron por triplicado.
- Se repitió este ensayo con tres muestras.
- El porcentaje de recuperación se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$C_{\text{hallada}} = \frac{A_{\text{MP}}}{A_{\text{St}}} \times C_{\text{St}}$$

Donde:

C_{hallada} : Concentración en µg/ml hallados

A_{mp} : Área muestra

A_{St} : Área del estándar

C_{St} : Concentración del estándar (µg/ml)

$$\% R = \frac{C_{\text{hallado}}}{C_{\text{agregado}}} \times 100$$

Donde:

% R: Porcentaje de recuperación

C_{hallado} : Área muestra (µg/ml)

C_{agregado} : Área del estándar (µg/ml)

II. RESULTADOS

Tabla 13. Valores del análisis de regresión lineal de soluciones de riboflavina 5 fosfato sódico en el rango 0,90 a 6,0 µg/ml. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Dato	%	X	Y	X ²	Y ²	XY
		µg/mLIny.	Area (nm)			
1	3	0.925	63.967	0.855	4091.731	59.144
2	3	0.925	62.727	0.855	3934.694	57.998
3	3	0.925	62.329	0.855	3884.864	57.629
4	5	1.541	105.339	2.375	11096.374	162.328
5	5	1.541	106.039	2.375	11244.193	163.406
6	5	1.541	105.031	2.375	11031.553	161.853
7	10	3.082	211.152	9.499	44584.956	650.769
8	10	3.082	210.951	9.499	44500.299	650.151
9	10	3.082	212.231	9.499	45042.167	654.097
10	15	4.623	316.227	21.372	99999.547	1461.918
11	15	4.623	318.333	21.372	101336.179	1471.655
12	15	4.623	314.944	21.372	99189.648	1455.986
13	20	6.164	430.064	37.995	184955.070	2650.915
14	20	6.164	434.497	37.995	188788.051	2678.242
15	20	6.164	425.287	37.995	180868.607	2621.466
Suma		49.004	3379.118	216.286	1034547.934	14957.555
Promedio.		3.267	225.275	14.419	68969.862	997.170

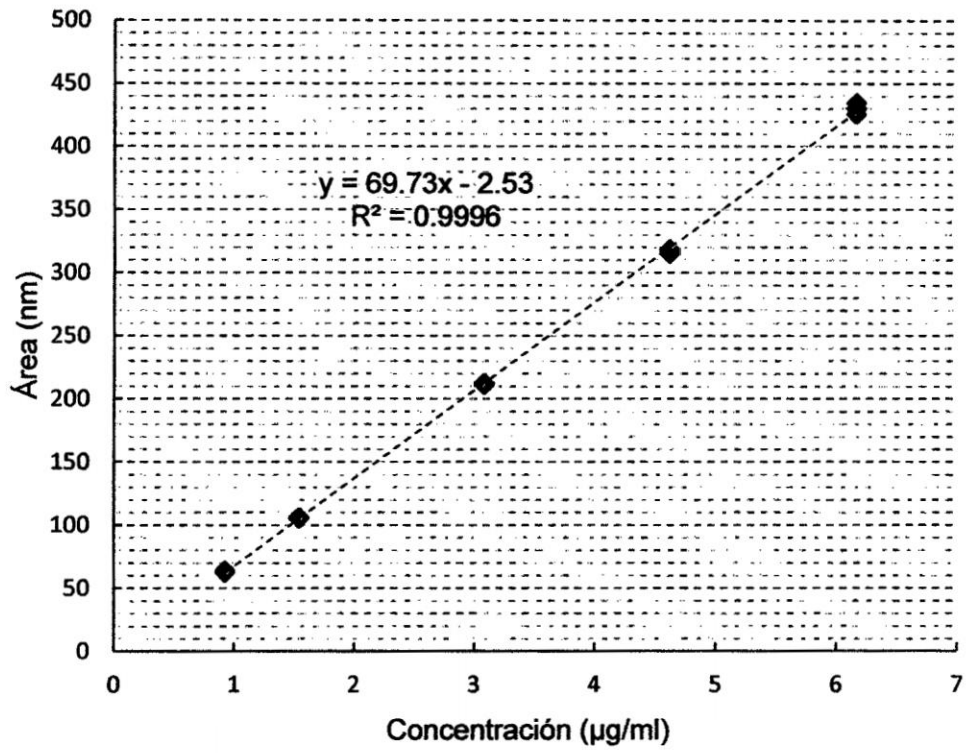


Figura 1. Área bajo la curva en fracción de la concentración de soluciones de riboflavina 5 fosfato sódico en el rango de 0,90 a 6,0 µg/ml. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Tabla 14. Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

X	Y	Y/X
µg/ml lny.	Área nm	Factor
0,9246	63,967	69,183
0,9246	62,727	67,842
0,9246	62,329	67,412
1,541	105,339	68,358
1,541	106,039	68,812
1,541	105,031	68,158
3,082	211,152	68,511
3,082	210,951	68,446
3,082	212,231	68,862
4,623	316,227	68,403
4,623	318,333	68,859
4,623	314,944	68,125
6,164	430,064	69,770
6,164	434,497	70,490
6,164	425,287	68,995
Xf = 68,681678 sf = 0,76		DSRf* = 1,1042117 %

*(DSRf ≤ 10%)

Tabla 15. Valores resultantes del límite de detección y cuantificación de riboflavina 5 fosfato sódico. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

%	µg/mL	Área (nm)			Área Media	Desviación Estándar	DSR
		Área 1	Área 2	Área 3			
1	0,308	22,059	20,024	22,317	21,467	1,256	5,851
3	0,925	63,967	62,727	62,329	63,007	0,854	1,356
5	1,540	105,339	106,039	105,031	105,470	0,516	0,489
Suma:	2,774				189,94	2,626	
Prom.:	0,925				63,31	0,87	

1. Respuesta a concentración cero: $y = 68,1x + 0,31$

2. Desviación estándar a concentración cero: $y = -0,60x + 1,43$

3, Tomando la pendiente $b = 69,7$ de la recta de regresión, los límites de detección y cuantificación son 0,07 y 0,21 µg/ml, respectivamente.

Tabla 16. Cantidad de analito recuperado de riboflavina 5 fosfato sódico en una superficie similar al equipo mediante muestreo por hisopos. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

N° muestra	Área (nm)			Área promedio
	corrida 1	corrida 2	corrida 3	
1	10,139	10,275	10,004	10,139
2	10,409	10,779	9,771	10,320
3	10,649	10,807	10,372	10,609
Áreas (nm)	: 13,5	12,5	12,9	
Promedio	: 12,99 nm			
Concentración estándar	: 0,30 µg/ml			

Tabla 17. Porcentaje de recuperación de riboflavina 5 fosfato sódico en función a la cantidad hallada y recuperada de analito. Laboratorios farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

N° Muestra	Agregado ($\mu\text{g/ml}$)	Hallado ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
1	3,060	2,388	78,032
2	3,060	2,430	79,421
3	3,060	2,498	81,650
Recuperación promedio			79,70

Tabla 18. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado con un límite de aceptación de 17,12 ($\mu\text{g}/\text{hisopo}$) de superficies del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Punto de muestreo	Resultados ($\mu\text{g}/\text{hisopo}$)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1 Hélice inferior izquierda	1,843	0,848	0,768
2 Hélice inferior media	0,805	0,205	ND
3 Hélice inferior derecha	0	ND	0,561
4 Hélice superior media	ND	0,801	0,594
5 Hélice superior derecha	ND	0	0,687
6 Hélice superior izquierda	ND	0,167	0,58
7 Eje central	0,514	0,206	ND
8 Parte interna del visor	1,119	0,497	ND
9 Parte media tapa del visor	0,797	0,483	1,389
10 Fondo del reactor	0,87	0,263	ND

ND: no detectable

Tabla 19. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados ($\mu\text{g/ml}$)*		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Agua de enjuague	ND	ND	ND

*Límite de aceptación 1,23 $\mu\text{g/ml}$ ND: No detectable

Tabla 20. pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados*		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Agua de enjuague	7,1	7,1	6,95

Límite de aceptación: 5 – 9

Tabla 21. Resultados de componente de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Componente del detergente	Resultados*		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Sulfato de sodio	No ↓	No ↓	No ↓
Tripolifosfato	No ↓	No ↓	No ↓
Lauril sulfato	No Esp.	No Esp.	No Esp.

*Especificación: No ↓, No Esp.

Tabla 22. Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

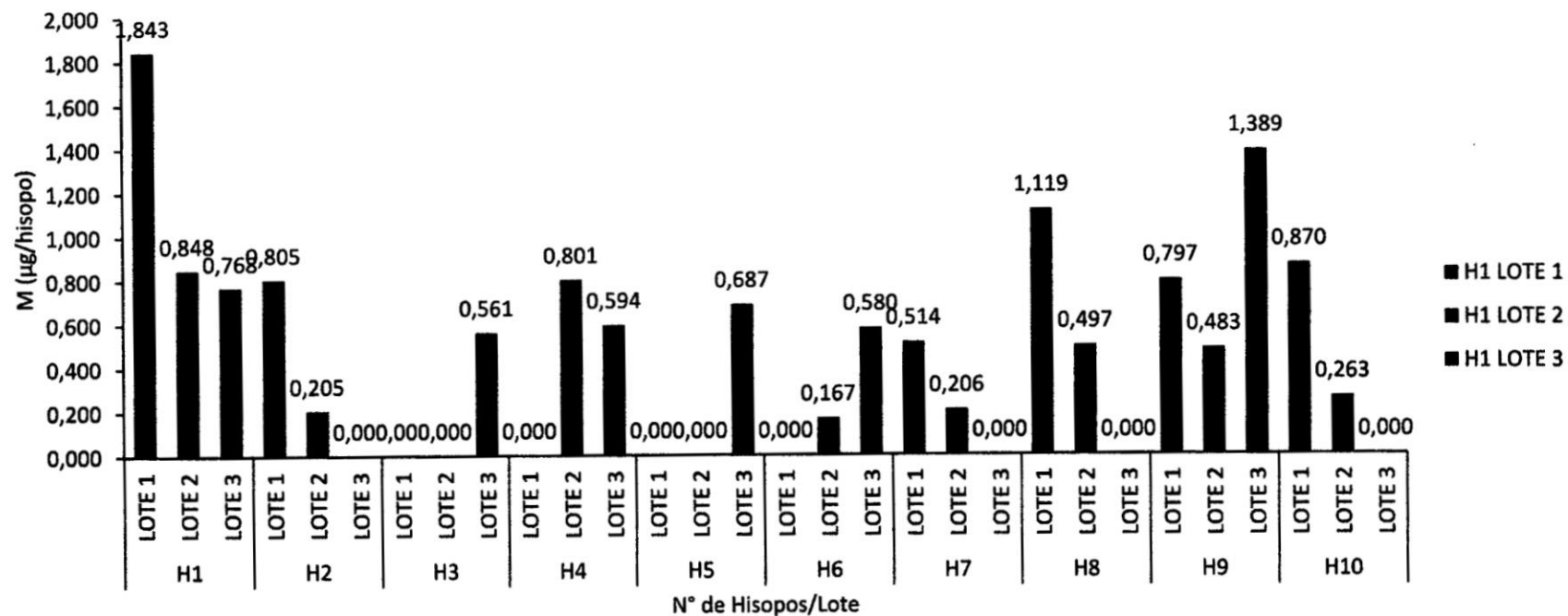
Punto de muestreo	Resultados (ufc/25 cm ²)*					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.
1	20	5	10	5	10	5
2	30	5	20	5	10	5
3	10	5	10	5	5	5
4	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5
6	10	5	5	5	5	5
7	5	5	5	5	5	5
8	5	5	5	5	5	5
9	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	5
	Patógenos: Ausente		Patógenos: Ausente		Patógenos: Ausente	

Estimado con un límite de aceptación <50/<30 (ufc/placa)

Tabla 23. Resultados de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados (ufc/25 placas)					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.
A	12	3	10	3	10	2
B	8	2	6	3	5	3
C	6	1	5	2	4	1
D	5	1	5	1	3	1

Estimado con un Límite de aceptación $\leq 20/\leq 10$ (ufc/placa)



Fuente Tabla 18

Figura 2: Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de 10 puntos de muestreo en las superficies del reactor de 1500 l, en el lote 1, 2 y 3. Laboratorios farmacéuticos Markos. S.A. Lima, 2012.

V. DISCUSIÓN

Para iniciar la validación de los métodos de limpieza se realizó la selección del producto prototipo en función a la filosofía del "peor caso", asumiendo que si el equipo queda limpio en las condiciones más desfavorables, quedara limpio en las condiciones más favorables. El principio activo riboflavina 5 fosfato sódico fue elegido como "peor caso" del grupo de productos fabricados en los equipos.

Para el análisis de trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en los equipos se realizó previamente la elección del hisopo a emplear, eligiendo el hisopo industrial debido a que no presenta interferencias, ya que en las condiciones de análisis se detecta un pico con tiempo de retención diferente al de la riboflavina 5 fosfato sódico, el que se debe probablemente al material adhesivo usado para la elaboración de los hisopos según señala Zayas.¹²

El límite de cuantificación y detección se relacionan con la cantidad de analitos requerida para dar un resultado significativo cualitativo o cuantitativo, el límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que pueda ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas y el límite de cuantificación es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas USP25.²⁹ La determinación del límite de cuantificación es laboriosa

por lo que solo se efectúa cuando el nivel inferior del rango del método analítico se acerca a los límites de detección y cuantificación como es el caso de impurezas y productos de degradación USP25.²⁹ Como resultado de la determinación de los límites de detección y cuantificación se obtuvo la ecuación de la recta en la que se demuestra que existe una correlación lineal entre la concentración del analito y las áreas, como se demuestra en tabla 13 y figura 1. Como se observa en la tabla 15 se obtuvo un límite de detección de 0,066017 µg/ml y un límite de cuantificación de 0,209602 µg/ml cumpliendo con el criterio de que los límites de detección y cuantificación deben ser menores a los límites de limpieza establecidos para los equipos como lo detalla Beneites.¹⁵ en 1998. Además comparando estos límites con los obtenidos por Martínez³⁰ en un trabajo de investigación similar a este, se demuestra la alta sensibilidad del método de análisis, haciendo factible su uso para fines de validación de métodos de limpieza.

Por otra parte la eficiencia del hisopado fue determinada mediante el estudio de recuperación. El porcentaje de recuperación promedio obtenido en el estudio fue de 79,70 por ciento como se demuestra en las tablas 16 y 17, que se encuentran dentro de los límites establecidos normalmente comprendidos entre 50 y 100 % según la AEFI⁷, o mayores al 60 % según Laughlin.²² El porcentaje de recuperación es usado para correlacionar la cantidad hallada con la cantidad real presente en las superficies del equipo. El porcentaje de recuperación además de demostrar la exactitud del método analítico proporciona información sobre la eficacia de la extracción de trazas de las fibras del hisopo.

Para el control analítico de trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en los equipos por motivos de seguridad se hizo uso del método del hisopado, siendo este el método más aconsejable según la FDA.⁵

Las trazas encontrados en los 10 puntos de muestreo del reactor de 1500 l

individualmente se encuentran dentro de los límites establecidos, asimismo las trazas de riboflavina 5 fosfato sódico más altos encontrados en el reactor de 1500 l, mediante este método fueron de 1,843; 0,848 y 1,389 ($\mu\text{g}/\text{hisopo}$) como se detalla en la tabla 18, en los tres lotes, respectivamente, estando estos dentro del límite especificado permitido menor a 17,12 $\mu\text{g}/\text{hisopo}$. De estos resultados se puede determinar que los puntos más críticos son: hélice inferior izquierda y parte media de la tapa del visor debiéndose poner especial cuidado durante la limpieza de estas zonas. Cabe señalar que si el componente no es detectado no quiere decir que el contaminante no esté presente después del proceso de limpieza, sino que se encuentra en niveles de concentración inferior a los límites de detección y cuantificación del método analítico según lo detalla Martínez.³⁰

El método del enjuague fue utilizado en el reactor de 1500 l, debido a que permite cubrir enteramente la superficie del equipo llegando a zonas en las que los hisopos no pueden llegar, se utilizó el volumen de líquido de enjuague mínimo cuidando de no diluir la muestra en exceso. En los análisis de aguas de enjuague del reactor de 1500 l, en los tres lotes demostraron una contaminación de ND, ND, ND, respectivamente, como se muestra en la Tabla 19, encontrándose debajo del límite establecido de 1,230 ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

Por otra parte, en la determinación de restos de detergente en el equipo reactor de 1500 l, según se muestra en la tabla 21, se observa que para el enjuague final del equipo hay ausencia de los componentes del detergente en los tres lotes y que el pH del agua del lavado final del equipo se encuentra dentro de los límites de aceptación tal como se muestra en la Tabla 20.

Asimismo, la determinación de la contaminación microbiológica en el equipo, así como el análisis de las aguas de lavado y el control de los ambientes de fabricación, fueron satisfactorios encontrándose los resultados dentro de los

límites especificados, como se muestra en las Tablas 22 y 23.

Teniendo en cuenta que los resultados de los análisis se encuentran dentro de los límites establecidos para su control, los métodos de limpieza aplicados a los equipos son confiables y se garantiza su uso sea cual sea el orden en el que se fabriquen los productos.

VI. CONCLUSIONES

1. Se validó el procedimiento de limpieza aplicado a los equipos de fabricación del área de líquidos.
2. Las trazas de riboflavina 5 fosfato sódico más altos encontrados en el reactor de 1500 l, fueron de 1,843; 0,848 y 1,389 ($\mu\text{g}/\text{hisopo}$) en los tres lotes, respectivamente, estando estos dentro del límite especificado permitido menor a 17,12 $\mu\text{g}/\text{hisopo}$; también hay ausencia de restos de detergente para el enjuague final y el pH del agua de lavado final del equipo se encuentra dentro de los límites de aceptación, demostrándose la ausencia de contaminantes de origen químico luego de aplicar el método de limpieza.
3. Hay ausencia de partículas luego de la inspección visual en el reactor de 1500 l en los tres lotes, demostrándose la ausencia de contaminantes de origen físico luego de aplicar el método de limpieza.
4. Hay ausencia de contaminación microbiológica en el equipo, así como el análisis de las aguas de lavado y el control de los ambientes de fabricación están dentro de los límites especificados para mesófilos aerobios viables menores a 50 ufc/cm², hongos y levaduras menores a 30 ufc/cm², demostrándose la ausencia de contaminantes de origen microbiológico.

VII. RECOMENDACIONES

1. Con el propósito de asegurar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos de formas líquidas se recomienda realizar en forma continua el seguimiento del procedimiento de limpieza aplicado a los equipos.
2. Se recomienda la revalidación cuando exista el incremento del tamaño de lote, cambios de principios activos, cambios de detergente, cambio de operario.
3. Se recomienda la revalidación cuando exista cambio en el tipo de limpieza ya sea semimanual o automática.
4. Se recomienda la validación de los equipos del área de envasado para complementar los resultados obtenidos referidos a la calidad en la fabricación del producto.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aura C. Aspectos técnicos y legales sobre validaciones en industria Farmacéutica: Validaciones en la industria farmacéutica: Lima; 2007.
2. Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas, DIGEMID. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura. Lima; 1999.
3. Aseguramiento de Calidad. [Sede Web]. Granda, 1998-[actualizada el 5 de mayo de 2012; acceso 15 de junio de 2012] Disponible en: <http://www.servitel.es/inforfarma97/programa/programa.htm#informaticaenlaindustriafarmaceutica>.
4. Fernández H. Implantación de un sistema de gestión de calidad norma ISO 9001-2000. Austria: Centro para la calidad en Austria; 2007.
5. Food and Drug Administration, FDA. [base de datos en internet]; 2000-[acceso 20 de mayo de 2012] Disponible en: http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/valis.html_23k.
6. OMS. Buenas Prácticas de Manufactura Vigentes. Serie de informes técnicos de la OMS 823. Informe 23 Organización mundial de la salud ginebra; 1996.
7. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, AEFI. Validación de métodos de limpieza. Sección Catalana. Barcelona: Anagrafic; 1994.
8. Lieberman A, Lachman L, Schwartz J. Pharmaceutical dosage forms: tablets. 2ª Ed. New York: Marcel Dekker; 1990.
9. Caro, CF. Validación de procesos no estériles (I) Industria Farmacéutica 1996. Marzo/Abril pág. 59-65
10. Flores J. Validación concurrente del proceso de fabricación de tabletas recubiertas de amoxicilina 500 mg [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Nacional de San Marcos; 2002.
11. Palomino E. Curso de validación de procesos en la industria farmacéutica. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2001.
12. Zayas L. Curso de prácticas actualizadas de validación en la industria farmacéutica. Lima: RaytheonEngineer–Constructors; 1998.
13. Bravo G. Curso taller de excelencia profesional en la industria farmacéutica. Lima: Centro de Trabajo e Investigaciones en Salud; 2001.
14. Bianchi, E. [base de datos en internet]. Cleaning validation for manufacture of pharmaceutical active ingredients; 1998-[acceso 20 de febrero de 2012]. Disponible en: http://www.Aschimfarma.com/farma/comm_qualita/pdf/broc

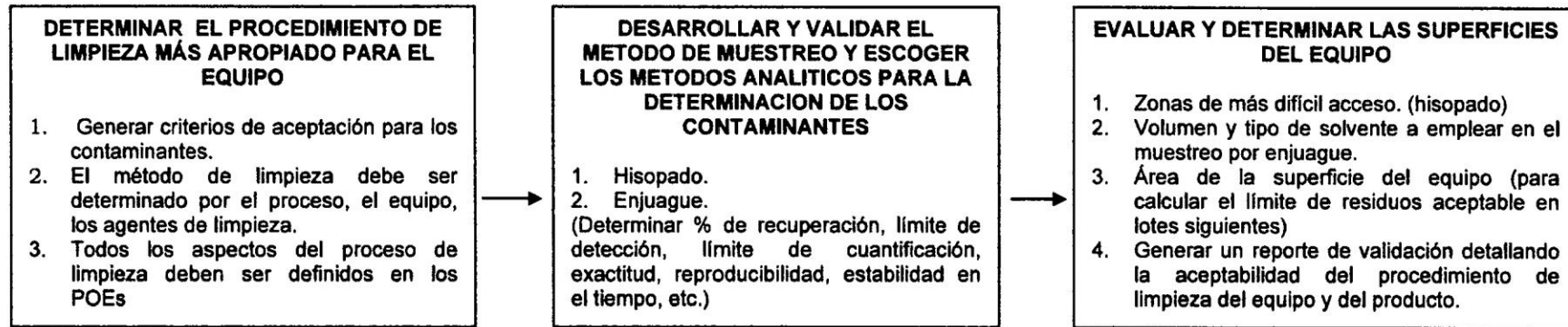
- hure-draft.pdf.
15. Beneites E. Good Manufacturing Practices. Madrid: Centro de Estudios Superiores de la Industria Farmacéutica; 1996.
 16. Castro M. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Sección Catalana. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad (1998). AEFI. España pp. 1-51, 66-67.
 17. Cuervo E. Programa de Control Microbiológico Ambiental en Zonas de Producción. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria España 1996, p. 8 – 38.
 18. Active Pharmaceutical Ingredient Comitte. [base de datos en internet] Cleaning validation in active pharmaceutical ingredient manufacturing plants; 1999-[acceso 20 de marzo de 2012] Disponible en <http://www.apic.cefic-org/pub/cleaningvalidation.pdf>.
 19. Active Pharmaceutical Ingredient Comitte. [base de datos en internet] Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredient plants 2000 -[acceso 8 de marzo de 2012] Disponible en <http://www.apic.cefic.org/pub/4CleaningVal9909.pdf>
 20. Cundell A. [base de datos en internet] Microbial monitoring cleaning validation. Microbilological Development & Statistics Wyeth-ayerst pharmaceuticals; 2000-[acceso 10 de febrero de 2012] Disponible en: <http://www.microbiol.org/files/PMFist>.
 21. Destin A. [base de datos en internet] LeBlanc: Cleaning validation technologie; 2002-[acceso 15 de abril de 2012] Disponible en internet: <http://www.cleaning validation.com>.
 22. Laughlin M. Pharmaceutical cleaning validation method references 2001.
 23. Active Pharmaceutical Ingredient Committee. [base de datos en internet] APIC: Cleaning validation in active pharmaceutical ingredient manufacturing plants; 1999-[acceso 30 de abril de 2012]. Disponible en <http://www.apic.cefic-org/pub/cleaningvalidation.pdf>.
 24. Ivthone I [base de datos en internet] Establishing limits and acceptance criteria. cleaning validation; 2002-[acceso 28 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.lvthome.com/free/sel/Cleaning%20Validation%2011.htm>.
 25. CECMED Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 16. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de

- Productos Farmacéuticos; 2006.
26. United States Pharmacopeia Convention, Pharmacopeia XXIV (USP31). 31 Ed. USA: The United States Pharmacopeia Convention; 2008.
 27. Michols, D [base de datos en internet] Health santé: Cleaning validation Guidelines; 2000-[acceso 30 de junio de 2012]. Disponible en: <http://www.hccs.gc.ca/hpbdgps/therapeut/zfiles/english/guides/validate/#vgpdf>
 28. Curtis D, John B. Casarett & Doull, Manual de toxicología. 5ª Ed. México DF: McGrawHill Interamericana; 1980.
 29. United States Pharmacopeia 25. National Formulary 20. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. Toronto Canada 2002. Pp.1982-1989.
 30. Martínez L, García L, Pérez N, Chang A. Determinación de trazas de lidocaína y epinefrina en el proceso de limpieza posterior a la fabricación de carpules. Revista Cubana de Farmacia [revista en internet] 2001 [acceso 20 enero de 2012]; 35(2):100-103. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475152001000200004&script=sci_arttext

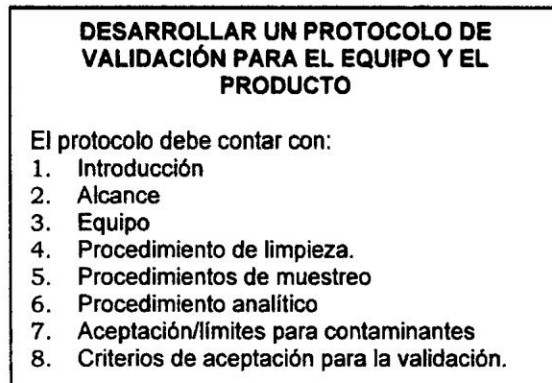
ANEXOS

Anexo 1

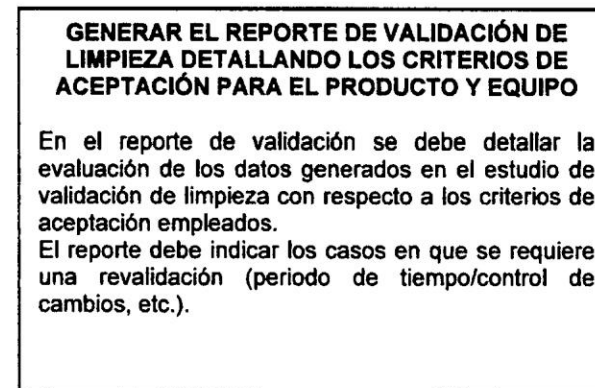
PASO 1



PASO 2



PASO 3



Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima, 2012

Figura 3. Proceso de validación de limpieza. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Anexo 2

Tabla 24. Lista de Equipos versus Productos del área de líquidos. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Código	Máquina	PRODUCTO 1	PRODUCTO 2	PRODUCTO 3	PRODUCTO 4	PRODUCTO 5	PRODUCTO 6	PRODUCTO 7	PRODUCTO 8	PRODUCTO 9	PRODUCTO 10	PRODUCTO 11	PRODUCTO 12	PRODUCTO 13	PRODUCTO 14	PRODUCTO 15	PRODUCTO 16	PRODUCTO 17	PRODUCTO 18	PRODUCTO 19	PRODUCTO 20
20.004	Bomba y filtro prensa	X	X	X			X		X				X	X						X	X
20.001	Envasadora de líquidos "Laundry"					X				X	X				X	X	X	X	X		
20.009	Envasadora de líquidos "Strunck"	X	X	X			X		X					X						X	X
20.013	Maquina gasificadora- enchapadora												X								
20.011	Maquina ajustadora de tapas	X	X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
20.002	Reactor de 1500 l	X	X	X		x	X		X				X	X	x	x	X			X	X
20.023	Marmita de 200 l				X			X					X					X	X		
20.016	Tanque de 1000 l "A"	X	X	X			X		X				X	X						X	X
20.017	Tanque de 1000 l "B"	X	X	X			X		X				X	X						X	X
20.018	Tanque de 600 l					X				X	X				X	X	X				
20.022	Tanque de 50 l											X									
20.019	Tanque de 280 l																	X			
20.020	Tanque de 100 l "A"					X		X		X	X		X			X	X				
20.021	Tanque de 100 l "B"					X		X		X	X		X			X	X				

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012

Anexo 3

Tabla 25. Lista de productos fabricados en el reactor de 1500 l incluidos en el grupo de validación versus tamaño de lote. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Producto	Tamaño de lote(L)
Broncodex pediátrico Jarabe.	1500
Broncodex Adulto Jarabe.	1500
Broncodex Compuesto Jarabe.	1500
Cortafan Suspensión	600
Dexabron NF Jarabe.	1500
Gripalert Jbe.	600
Limonada Purgante Markos solución.	1200
Maldex Compuesto Jarabe.	1500
Magacid Suspensión.	600
Novotrim Balsámico Suspensión.	600
Novotrim Pediátrico Suspensión.	400
Vitaveran B12 NF Jarabe.	2000
Vitaveran B12 CIP Jarabe.	2000

Menor tamaño de lote: Novotrim Pediátrico Suspensión 400 litros LOTE B. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A., Lima-2012

Fórmula	Tamaño de lote (l)	Dosis de administración (ml)	Extracto de hígado	Glicerina	Glicerol 85%	Goma xantán	Guaifenesina	Hidroxietyl celulosa 6Cps	Maleato de clorfenamina	Magaldrato en pasta	Mentol	Metabisulfito de sodio	Metilparabeno	Nicotinamida	Nifuroxazida	Paracetamol	Picosulfato de sodio	Piridoxina.HCl	Polietilenglicol 400	Propilparabeno	Propilenglicol	Pseudoefedrina.HCl	Riboflavina 5 fosfato sódica	Sacarosa	Sacarina sódica	Sorbitol 70%	Sulfoguayacol	Sulfametoxazol	Tiamina.HCl	Trimetoprima	Tripolidina.HCl	Trisilicato de Aluminio y Magnesio			
1	1500,00	5,00			X			X			X																								
2	1500,00	5,00			X			X			X																								
3	1500,00	5,00			X			X			X																								
5	600,00	5,00		X					X																										
6	1500,00	10,00							X																										
8	600,00	10,00		X																															
12	1200,00	200,00																																	
13	1500,00	10,00								X																									
14	600,00	10,00					X																												
15	600,00	5,00		X						X																									
16	400,00	5,00			X																														
19	2000,00	5,00	X																																
20	2000,00	5,00	X																																

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A., Lima-2012.

Anexo 5

Tabla 27. Datos de los insumos. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Insumo	Solubilidad	Clasificación solubilidad	Toxicidad DL ₅₀ (g/kg)	Clasificación Toxicidad	Dosis Terap. (g)	Clasificación Dosis terap.	Mayor dosis diaria (mg)	Clasificación mayor dosis
Alcohol etílico	Miscible	1	7,060	1	494,2	1	Excipiente	1
Acidocítrico	muy soluble	1	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
AcidoTartarico	muy soluble	1	6,600	1	1,50	1	3000,00	4
AcidoFosforico	Miscible	1	1,53	2	0,880	2	1760,00	2
Atapulgita activada	Insoluble	5	≥ 1,678	1	0,525	2	2,000.00	1
Ambroxol HCL*	practicamente insoluble	5	4,203	1	0,0075	4	180,00	1
Benzoato de sodio	libremente soluble	1	4,22	1	295,4	1	Excipiente	1
Bicarbonato de sodio	Soluble	2	4,22	1	295,40	1	Excipiente	1
Carboximetil celulosa sódica	Insoluble	5	27,000	1	1890,0	1	Excipiente	1
CetirizinaDiclorhidrato	libremente soluble	3	0,365	2	0,005	4	20,00	1
Ciproheptadina*	poco soluble	2	2,47	1	0,00133	4	7,98	1
Cianocobalamina	Soluble	2	0,739	2	0,000015	5	0,09	1
Citrato de hierro amoniacal	muy soluble	1	3,25	1	0,057	3	300,0	1
Citrato de sodio	muy soluble	1	≥ 1,678	1	117,460	1	Excipiente	1
Clembuterol HCL	muy soluble	1	0,240	2	0,000005	5	0,060	1
Colorante rojo n°3	ligeramente soluble	3	5,000	1	350,0	1	Excipiente	1
Colorante amarillo FDC 6	libremente soluble	1	10,000	1	700,0	1	Excipiente	1
Colorante rojo fresa 304 extra	ligeramente soluble	3	5,000	1	350,0	1	Excipiente	1
Cloruro de amonio	libremente soluble	1	1,44	2	0,105	2	800,00	2
Dextrometorfano bromhidrato	ligeramente soluble	3	0,350	2	0,01	3	80,00	1
Dimeticona 100%	practicamente insoluble	5	≥ 1,678	1	0,03	4	600,0	1
Edetatodisodicodihidratado	Soluble	1	2,0	1	140,0	1	Excipiente	1
Esencia de Albaricoque	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de anís	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,460	1	Excipiente	1
Esencia de cereza FC 5556-00	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de cereza BC 78 ^a	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de fresa	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de limón HS	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de pera	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de piña	ligeramente soluble	3	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Esencia de tofee	Soluble	1	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1

Esencia de vainilla	Soluble	1	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Extracto de hígado	Soluble	1	≥ 1,678	1	0,023	3	138,0	1
Glicerina	Soluble	2	12,6	1	882,0	1	Excipiente	1
Guaifenesina	Soluble	2	1,51	2	0,050	3	2400,00	3
Hidroxietilcelulosa 6 CPS	Soluble	2	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Maleato de clorfenamina	libremente soluble	1	0,360	2	0,0025	4	20,0	1
Magaldrato en pasta	Insoluble	5	≥ 1,678	1	0,4	2	8,0	1
Mentol	ligeramente soluble	3	3,3	1	231,0	1	Excipiente	1
Metabisulfito de sodio	libremente soluble	1	0,12	3	8,4	1	Excipiente	1
Metilparabeno	ligeramente soluble	3	6,33	1	443,1	1	Excipiente	1
Nicotinamida	libremente soluble	2	3,500	1	0,015	3	90,0	1
Nifuroxazida	practicamente insoluble	5	1,677	2	0,20	2	80,0	1
Paracetamol	muy ligeramente soluble	4	1,944	1	0,015	3	1300,0	2
Picosulfato de sodio	libremente soluble	1	17,0	1	0,00125	4	2,50	1
Piridoxina.HCl	libremente soluble	1	4,000	1	0,0010	5	6,0	1
Polietilenglicol	Soluble	1	27,5	1	1925,0	1	Excipiente	1
Propilparabeno	muy ligeramente soluble	4	12,66	1	886,2	1	Excipiente	1
Propilenglicol	Miscible	1	33,700	1	2359,0	1	Excipiente	1
Pseudoefedrina HCL	muy ligeramente soluble	4	1,60	2	0,015	3	180,0	1
Riboflavina 5 fosfato sódico	muy ligeramente soluble	4	0,56	2	0,00050	5	3,0	1
Sacarosa	muy soluble	1	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Sacarina sódica	libremente soluble	1	≥ 1,678	1	117,46	1	Excipiente	1
Sorbitol	Miscible	1	15,90	1	1113,0	1	Excipiente	1
Sulfoguaiacol**	muy soluble	1	0,725	2	0,1	2	800,0	2
Sulfametoxazol	practicamente insoluble	5	3,662	1	0,80	2	2400,0	3
Tiamina clorhidrato	libremente soluble	1	3,710	1	0,00005	5	3,00	1
Trimetoprima	muy ligeramente soluble	4	5,300	1	0,160	2	480,0	1
Tripolidina HCL	Soluble	1	0,840	2	0,00125	4	15,0	1
Trisilicato de aluminio y magnesio	Insoluble	5	0,035	3	2.45	1	Excipiente	1

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012

Anexo 6

Tabla 28. Matriz de solubilidad, toxicidad, dosis terapéutica y mayor dosis diaria. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012*.

Insumo	Solubilidad	Toxicidad DL ₅₀	Dosis terapéutica	Mayor dosis diaria	Clasificación combinada
Alcohol etílico	1	1	1	1	4
Acidocítrico	1	1	1	1	4
AcidoTartarico	1	1	1	4	7
AcidoFosforico	1	2	2	2	7
Atapulgita activada	5	1	2	1	9
Ambroxol HCL*	5	1	4	1	11
Benzoato de sodio	1	1	1	1	4
Bicarbonato de sodio	2	1	1	1	5
Carboximetil celulosa sódica	5	1	1	1	8
CetirizinaDiclorhidrato	3	2	4	1	10
Ciproheptadina*	2	1	4	1	8
Cianocobalamina	2	2	5	1	10
Citrato de hierro amoniacal	1	1	3	1	6
Citrato de sodio	1	1	1	1	4
Clembuterol HCL	1	2	5	1	9
Colorante rojo n°3	3	1	1	1	6
Colorante amarillo FDC 6	1	1	1	1	4
Colorante rojo fresa 304 extra	3	1	1	1	6
Cloruro de amonio	1	2	2	2	7
Dextrometorfano bromhidrato	3	2	3	1	9
Dimeticona 100%	5	1	4	1	11
Edetatodisodicodihidratado	1	1	1	1	4
Esencia de Albaricoque	3	1	1	1	6
Esencia de anis	3	1	1	1	6
Esencia de cereza FC 5556-00	3	1	1	1	6
Esencia de cereza BC 78 ^a	3	1	1	1	6
Esencia de fresa	3	1	1	1	6
Esencia de limon HS	3	1	1	1	6
Esencia de pera	3	1	1	1	6
Esencia de piña	3	1	1	1	6
Esencia de platano	3	1	1	1	6
Esencia de tofee	1	1	1	1	4
Esencia de vainilla	1	1	1	1	4
Extracto de hígado	1	1	3	1	6
Glicerina	2	1	1	1	5
Glicerol 85%	5	1	1	1	8

Goma xantan	2	1	1	1	5
Guaifenesina	2	2	3	3	10
Hidroxietilcelulosa 6 CPS	2	1	1	1	5
Maleato de clorfenamina	1	2	4	1	8
Magaldrato en pasta	5	1	2	1	9
Mentol	3	1	1	1	6
Metabisulfito de sodio	1	3	1	1	6
Metilparabeno	3	1	1	1	6
Nicotinamida	2	1	3	1	7
Nifuroxazida	5	2	2	1	10
Paracetamol	4	1	3	2	10
Picosulfato de sodio*	1	1	4	1	7
Piridoxina.HCl	1	1	5	1	8
Polietilenglicol	1	1	1	1	4
Propilparabeno	4	1	1	1	7
Propilenglicol	1	1	1	1	4
Pseudoefedrina HCL	4	2	3	1	10
Riboflavina 5 fosfato sódico	4	2	5	1	12
Sacarosa	1	1	1	1	4
Sacarina sódica	1	1	1	1	4
Sorbitol	1	1	1	1	4
Sulfoguayacol**	1	2	2	2	7
Sulfametoxazol	5	1	2	3	11
Tiamina clorhidrato	1	1	5	1	8
Trimetoprima	4	1	2	1	8
Tripolidina HCL	1	2	4	1	8
Trisilicato de aluminio y magnesio	5	3	1	1	10

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012

*Los criterios para tomar los datos se indican en las tablas: 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

Anexo 7

Tabla 29. Selección del peor caso de contaminación - selección del producto prototipo. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Insumo	Solubilidad	Toxicidad dl ₅₀	Dosis terapéutica	Mayor dosis Diaria	Clasificación Combinada	Producto
Riboflavina 5 fosfato sódico	4	2	5	1	12	Vitaveran NF B12
Ambroxol HCL*	5	1	4	1	11	Broncodex
Dimeticona 100%	5	1	4	1	11	Magacid
Sulfametoxazol	5	1	2	3	11	Novotrim
Cianocobalamina	2	2	5	1	10	Vitaveran NF B12
CetirizinaDiclorhidrato	3	2	4	1	10	Gripalert
Guaifenesina	2	2	3	3	10	Novotrimbalsamico
Nifuroxazida	5	2	2	1	10	Cortafan
Paracetamol	4	1	3	2	10	Gripalert
Pseudoefedrina HCL	4	2	3	1	10	Gripalert
Atapulgita activada	5	1	2	1	9	Cortafan
Clembuterol HCL	1	2	5	1	9	Broncodex
Dextrometorfano bromhidrato	3	2	3	1	9	Dexabron NF
Magaldrato en pasta	5	1	2	1	9	Magacid
Carboximetil celulosa sódica	5	1	1	1	8	varios
Ciproheptadina*	2	1	4	1	8	Vitaverancip
Glicerol 85%	5	1	1	1	8	varios
Maleato de clorfenamina	1	2	4	1	8	Dexabron NF
Piridoxina.HCl	1	1	5	1	8	Vitaveran NF B12
Tiamina clorhidrato	1	1	5	1	8	Vitaveran NF B12
Trimetoprima	4	1	2	1	8	Novotrimbalsamico
Tripolidina HCL	1	2	4	1	8	Maldex C.
Nicotinamida	2	1	3	1	7	Vitaveran NF B12
Cloruro de amonio	1	2	2	2	7	varios
Picosulfato de sodio*	1	1	4	1	7	Limonada Purgante
Propilparabeno	4	1	1	1	7	varios
Sulfoguaiacol**	1	2	2	2	7	Dexabron NF

AcidoTartarico	1	1	1	4	7	Limonada Purgante
AcidoFosforico	1	2	2	2	7	Limonada Purgante
Citrato de hierro amoniacal	1	1	3	1	6	Vitaveran NF B12
Colorante rojo n°3	3	1	1	1	6	varios
Colorante rojo fresa 304 extra	3	1	1	1	6	Maldex C.
Esencia de Albaricoque	3	1	1	1	6	varios
Esencia de cereza FC 5556-00	3	1	1	1	6	varios
Esencia de cereza BC 78ª	3	1	1	1	6	varios
Esencia de fresa	3	1	1	1	6	varios
Esencia de limon HS	3	1	1	1	6	varios
Esencia de pera	3	1	1	1	6	varios
Esencia de piña	3	1	1	1	6	varios
Esencia de platano	3	1	1	1	6	varios
Extracto de higado	1	1	3	1	6	Vitaveran NF B12
Mentol	3	1	1	1	6	varios
Metabisulfito de sodio	1	3	1	1	6	varios
Metilparabeno	3	1	1	1	6	varios
Bicarbonato de sodio	2	1	1	1	5	varios
Glicerina	2	1	1	1	5	varios
Goma xantan	2	1	1	1	5	varios
Hidroxietilcelulosa 6 CPS	2	1	1	1	5	varios
Edetatodisodicodihidratado	1	1	1	1	4	varios
Esencia de tofee	1	1	1	1	4	varios
Esencia de vainilla	1	1	1	1	4	varios
Polietilenglicol	1	1	1	1	4	varios
Sacarosa	1	1	1	1	4	varios
Sacarina sódica	1	1	1	1	4	varios
Sorbitol	1	1	1	1	4	varios
Alcohol etílico	1	1	1	1	4	varios
Acidocitrico	1	1	1	1	4	varios
Propilenglicol	1	1	1	1	4	varios
Benzoato de sodio	1	1	1	1	4	varios

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012.

Anexo 8

Tabla 30. Datos de todos los productos fabricados en el reactor de 1500 litros y determinación del peor caso de contaminación del siguiente lote (PRODUCTO B)*. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Producto	Contaminante	Tamaño de lote (Unidades)	Tamaño de lote (L)	Administración por vez (mL)	Nº Unidades diarias	Cantidad administ. por día (L)	Dosis terapéutica mg/5mL	Máxima dosis diaria de B (g)
1	AmbroxolHCl	12500	1500,00	10	3	0,03	15	0,09
2	AmbroxolHCl	12500	1500	10	3	0,03	30	0,18
3	AmbroxolHCl	12500	1500	20	3	0,06	7,5	0,09
	Clembuterol				3		0,005	0,00006
5	Atapulgita Activada	6000	600	5	4	0,02	200	0,8
	Nifuroxazida				4		500	2
6	Clorfenaminamaleato	12500	1500	10	4	0,04	2,5	0,02
	Dextrometorfano bromhidrato				4		10	0,08
	Cloruro de Amonio				4		100	0,8
	Sulfoguyacolato				4		100	0,8
8	PseudoefedrinaHCl	10000	600	10	2	0,02	325	1,3
	Paracetamol				2		15	0,06
	CetirizinaDiclorhidrato				2		5	0,02
12	Picosulfato de sodio	6000	1200	200	1	0,2	2,5	0,005
	AcidoTartarico				1		3000	6
	Ácido fosfórico				1		1760	3,52
13	Dextrometorfano bromhidrato	12500	1500	10	4	0,04	10	0,08

Extracto de hígado	3	23,3	0,14
Citrato Ferrico amoniacal	3	50	0,3
Ciproheptadina	3	1,33	0,008
Cianocobalamina	3	0,015	0,00009

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012.

Menor tamaño de lote (l): 400,00

Mayor dosificación diaria (l): 0,200

Máxima dosis terap. de B(g): 6,000

Menor número de unidades de B en el lote: 4000

Máximo número de dosis diaria de B: 4

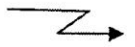
Área del equipo (cm²): 35785,024

Menor tamaño de lote (kg): 454,00, considerando 1,13 g/ml como densidad

Anexo 9

Tabla 31. Datos de los productos fabricados en el equipo: reactor 1500 litros y determinación de la cantidad máxima aceptable en el lote siguiente para cada contaminante. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Producto	Contaminante	Dosis ter. (mg)	DL ₅₀ mg/Kg	NOEL mg	ADI mg	MACO mg
1	AmbroxolHCl	15,0	4203	147,11	0,147	294,21
2	AmbroxolHCl	30	4203	147,11	0,147	294,21
3	AmbroxolHCl	7,5	4203	147,11	0,147	294,21
	Clembuterol	0,0050	240	8,40	0,008	16,80
5	Atapulgita Activada	500	1678	58,73	0,059	117,46
	Nifuroxazida	200	1677	58,70	0,059	117,39
6	Clorfenaminamaleato	2,50	360	12,60	0,013	25,20
	Dextrometorfano bromhidrato	10,0	350	12,25	0,012	24,50
	Cloruro de Amonio	100,0	1440	50,40	0,050	100,80
	Sulfoguaiacolato	100,0	725	25,38	0,025	50,75
8	PseudoefedrinaHCl	15,00	1600	56,00	0,056	112,00
	Paracetamol	325,00	1944	68,04	0,068	136,08
	CetirizinaDiclorhidrato	5,00	365	12,78	0,013	25,55
12	Picosulfato de sodio	2,5	17000	595,00	0,595	1190,00
	AcidoTartarico	3000	6600	231,00	0,231	462,00
	Acidofosforico	1760	1530	53,55	0,054	107,10
13	Dextrometorfano bromhidrato	10	350	12,25	0,012	24,50
	TripolidinaHCl	1,25	840	29,40	0,029	58,80
	PseudoefedrinaHCl	15	1600	56,00	0,056	112,00
	Guaifenesina	100	1510	52,85	0,053	105,70
14	Simeticona 100%	30	1678	58,73	0,059	117,46
	Magaldrato en pasta	340	1678	58,73	0,059	117,46



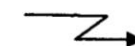
15	Trimetoprima	40	5300	185,50	0,186	371,00
	Sulfametoxazol	200	3662	128,17	0,128	256,34
	Guaifenesina	50	1510	52,85	0,053	105,70
	Cloruro de amonio	25	1440	50,40	0,050	100,80
16	Sulfametoxazol	200	3662	128,17	0,128	256,34
	Trimetoprima	40	5300	185,50	0,186	371,00
19	Nicotinamida	15	3500	122,50	0,123	245,00
	PiridoxinaHCl	1	4000	140,00	0,140	280,00
	Tiamina HCl	0.5	3710	129,85	0,130	259,70
	Riboflavina 5 Fosfato sodico	0.5	560	19,6	0,0196	39,20
	Extracto de higado	23.3	1678	58,73	0,05873	117,46
	Citrato Ferrico amoniacal	50	3250	113,75	0,11375	227,50
	Cianocobalamina	0.015	739	25,865	0,025865	51,73
20	Nicotinamida	15	3500	122,5	0,1225	245,00
	PiridoxinaHCl	1	4000	140	0,14	280,00
	Tiamina HCl	0.5	3710	129,85	0,12985	259,70
	Riboflavina 5 Fosfato sodico	0.5	560	19,6	0,0196	39,20
	Extracto de higado	23.3	1678	58,73	0,05873	117,46
	Citrato Ferrico amoniacal	50	3250	113,75	0,11375	227,50
	Ciproheptadina	1.33	2470	86,45	0,08645	172,90
	Cianocobalamina	0.015	739	25,865	0,025865	51,73

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012

Anexo 10

Tabla 32. Determinación de los límites de limpieza para cada contaminante de los productos fabricados en el reactor de 1500 litros. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Producto	Contaminante	Dosis terap. mg	Límite dosis terapéut. diaria µg/hisopo	Límite dosis terapéut. diaria µg/mL	MACO mg	Límite Toxicidad µg/hisopo	Límite Toxicidad µg/MI	Límite más estricto µg/hisopo	Límite más estricto µg/mL
1	Ambroxol HCl	15,0	698,61627	50,00	294,21	205,540	14,711	205,54	14,71
2	Ambroxol HCl	30,0	1397,23	100,00	294,21	205,540	14,711	205,54	14,71
3	Ambroxol HCl	7,5	349,31	25,00	294,21	205,540	14,711	205,54	14,71
	Clembuterol	0,005	0,23	0,02	16,80	11,737	0,840	0,23	0,02
5	Atapulgita Activada	500	23287,21	1666,67	117,46	82,060	5,873	82,06	5,87
	Nifuroxazida	200	9314,88	666,67	117,39	82,011	5,870	82,01	5,87
6	Clorfenaminamaleato	2,5	116,44	8,33	25,20	17,605	1,260	17,61	1,26
	Dextrometorfano bromhidrato	10,0	465,74	33,33	24,50	17,116	1,225	17,12	1,23
	Cloruro de Amonio	100	4657,44	333,33	100,80	70,421	5,040	70,42	5,04
	Sulfoguayacolato	100	4657,44	333,33	50,75	35,455	2,538	35,45	2,54
8	PseudoefedrinaH Cl	15,00	698,62	50,00	112,00	78,245	5,600	78,25	5,60
	Paracetamol	325,00	15136,69	1083,33	136,08	95,068	6,804	95,07	6,80
	CetirizinaDiclorhidrato	5,00	232,87	16,67	25,55	17,850	1,278	17,85	1,28
12	Picosulfato de sodio	2,5	116,44	8,33	1190,00	831,354	59,500	116,44	8,33
	AcidoTartarico	3000	139723,25	10000,00	462,00	322,761	23,100	322,76	23,10
	Acidofosforico	1760	81970,98	5866,67	107,10	74,822	5,355	74,82	5,36
13	Dextrometorfano bromhidrato	10,0	465,74	33,33	24,50	17,116	1,225	17,12	1,23
	Tripolidina HCl	1,25	58,22	4,17	58,80	41,079	2,940	41,08	2,94
	Pseudoefedrina HCl	15	698,62	50,00	112,00	78,245	5,600	78,25	5,60



	Guaifenesina	100	4657,44	333,33	105,70	73,844	5,285	73,84	5,29
14	Simeticona 100%	30	1397,23	100,00	117,46	82,060	5,873	82,06	5,87
	Magaldrato en pasta	340	15835,30	1133,33	117,46	82,060	5,873	82,06	5,87
15	Trimetoprima	40	1862,98	133,33	371,00	259,187	18,550	259,19	18,55
	Sulfametoxazol	200	9314,88	666,67	256,34	179,083	12,817	179,08	12,82
	Guaifenesina	50	2328,72	166,67	105,70	73,844	5,285	73,84	5,29
	Cloruro de amonio	25	1164,36	83,33	100,80	70,421	5,040	70,42	5,04
16	Sulfametoxazol	200	9314,88	666,67	256,34	179,083	12,817	179,08	12,82
	Trimetoprima	40	1862,98	133,33	371,00	259,187	18,550	259,19	18,55
19	Nicotinamida	15	698,62	50,00	245,00	171,161	12,250	171,16	12,25
	Piridoxina HCl	1	46,57	3,33	280,00	195,613	14,000	46,57	3,33
	Tiamina HCl	0,5	23,29	1,67	259,70	181,431	12,985	23,29	1,67
	Riboflavina 5 Fosfato sódico	0,5	23,29	1,67	39,20	27,386	1,960	23,29	1,67
	Extracto de hígado	23,3	1085,18	77,67	117,46	82,060	5,873	82,06	5,87
	Citrato Ferrico amoniaco	50	2328,72	166,67	227,50	158,935	11,375	158,94	11,38
	Cianocobalamina	0,015	0,70	0,05	51,73	36,139	2,587	0,70	0,05
20	Nicotinamida	15	698,62	50,00	245,00	171,161	12,250	171,16	12,25
	Piridoxina HCl	1	46,57	3,33	280,00	195,613	14,000	46,57	3,33
	Tiamina HCl	0,5	23,29	1,67	259,70	181,431	12,985	23,29	1,67
	Riboflavina 5 Fosfato sódico	0,5	23,29	1,67	39,20	27,386	1,960	23,29	1,67
	Extracto de hígado	23,3	1085,18	77,67	117,46	82,060	5,873	82,06	5,87
	Citrato Férrico amoniaco	50	2328,72	166,67	227,50	158,935	11,375	158,94	11,38
	Ciproheptadina	1,33	61,94	4,43	172,90	120,791	8,645	61,94	4,43
	Cianocobalamina	0,015	0,70	0,05	51,73	36,139	2,587	0,70	0,05

Fuente: Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A Lima-2012

Anexo 11

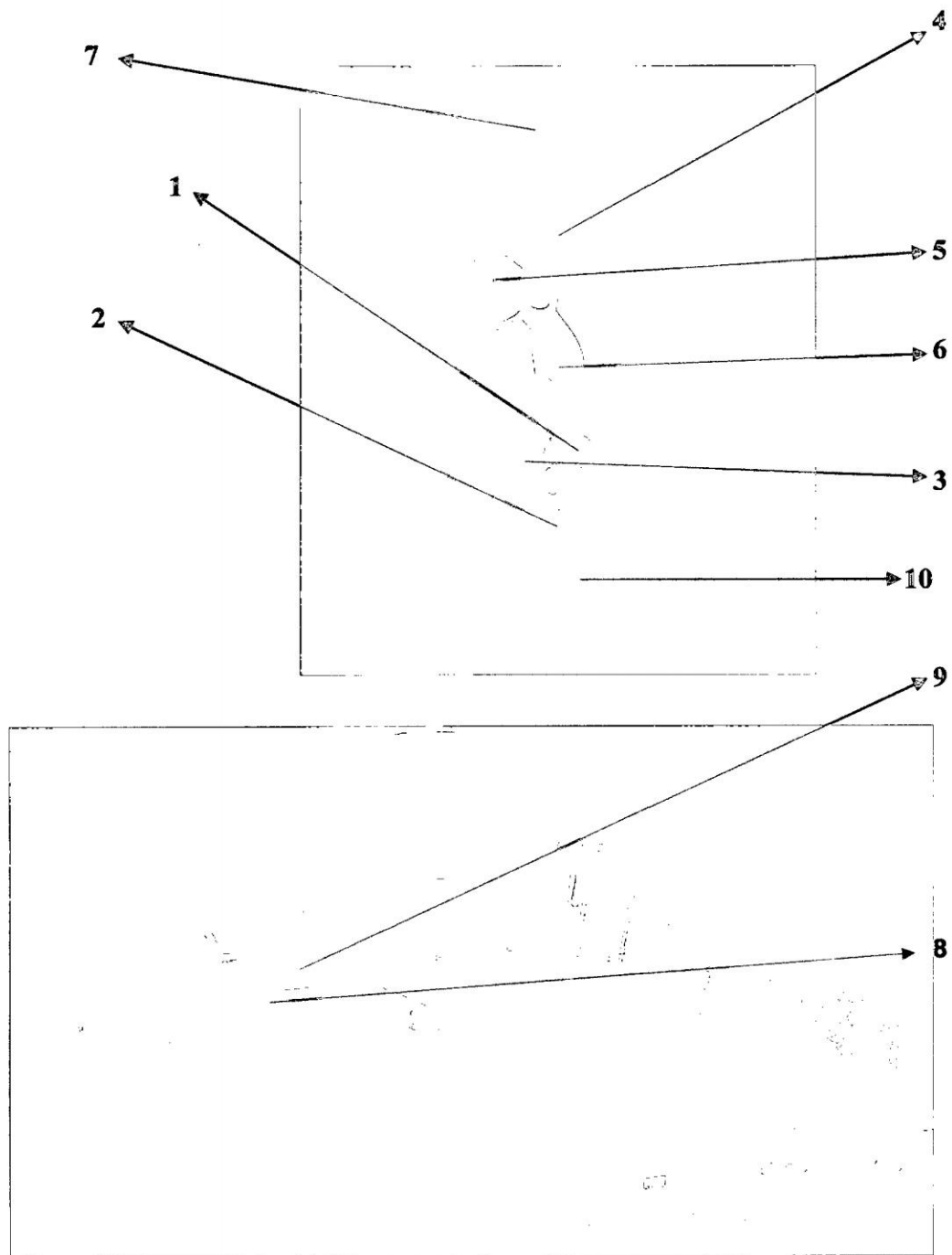
Tabla 33. Test de linealidad*. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Parámetro	Valor
Criterio de aceptación	$r > 0,995$
Ecuación de la recta	$y = 69,7 + x - 2,5$
Pendiente	$b = 69,726$
Coeficiente de correlación	$r = 0,999$
Coeficiente de determinación	$r^2 = 0,999$
Test de hipótesis para demostrar regresión lineal	
$t_{\text{tabla}} (v: 13; \alpha: 0,05)$	2,214
t_{exp}	177,52

*El método analítico es lineal si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$

Anexo 12

Figura 4. Puntos de muestreo no probabilístico, método hisopado. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.



1) Hélice inferior izquierda, 2) Hélice inferior media, 3) Hélice inferior derecha, 4) Hélice superior media, 5) Hélice superior derecha, 6) Hélice superior izquierda, 7) Eje central, 8) Parte interna del visor 9) Parte media del visor, 10) Fondo del reactor

Anexo 13

Tabla 33. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Hisopo N°	Resultado					
	Corrida 1	Corrida 2	Promedio	Desv. Est.	Prom. + 3 DS	M (ug/hisopo)
1	6,072	5,771	5,900	0,213	6,560	1,843
2	2,686	2,574	2,600	0,079	2,867	0,805
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	,2000	4,923	2,500	3,481	12,904	ND
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ND
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	ND
7	1,697	1,747	1,700	0,035	1,829	0,514
8	1,588	2,502	2,000	0,646	3,984	1,119
9	2,530	2,340	2,400	0,134	2,838	0,797
10	2,275	2,589	2,400	0,222	3,098	0,870

ND : No Detectable valor menor al límite de detección
 % Recuperación : 79,7
 Estándar de concentración : 32,303(µg/ml)
 Áreas nm : 1430,137nm; 1455,317nm
 Promedio : 1472,727
 Límite de aceptación : 17,12 (µg/hisopo)
 Valor Máximo : 1,843 (µg/hisopo)

Anexo 14

Tabla 34. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Corrida 1	Corrida 2	Promedio	Desv. est	Prom + 3DS	M (µg/mL)	M (µg/ml)
0	0	0	0	0	0	ND

ND : No Detectable valor menor al límite de detección
 Estándar concentración : 32,303(µg/ml)
 Áreas nm : 1448,208nm; 1472,4541nm
 Promedio : 1460,3 nm
 M : cantidad de contaminante encontrado
 Límite de aceptación : 1,230 (µg/ml)

Anexo 15

Tabla 35. pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados (pH)
Blanco agua + Detergente	10,3
Blanco agua	6,9
Agua enjuague inicial	8,1
Agua Enjuague Final	7,1

Anexo 16

Tabla 36. Presencia de componente de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados		
	Sulfato de sodio	Tripolifosfato de sodio	Lauril sulfato de sodio
Blanco agua + Detergente	↓ Blanco	↓ Amarillo	Espuma cte
Blanco agua	No ↓	No ↓	No Esp.
Agua enjuague inicial	No ↓	No ↓	No Esp.
Agua enjuague final	No ↓	No ↓	No Esp.

↓: Precipitado

Anexo 17

Tabla 37. Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Hisopo N°	Resultados (ufc/25 cm ²)					
	Mesófilos aerobios viables	Hongos y levaduras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	≤ 50 ufc/25cm ²	≤ 30 ufc/25cm ²	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	20	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	30	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	10	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	5	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	10	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Anexo 18

Tabla 38. Resultados de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles. Lote 1. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Sección fabricación	Resultados (ufc/placa)	
	Mesófilos aerobios viables	Hongos y levaduras
	≤ 20 ufc/placa	≤ 10 ufc/placa
A	12	3
B	8	2
C	6	1
D	5	1

Anexo 19

Tabla 39. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Hisopo N°	Resultados					
	Corrida 1	Corrida 2	Promedio	Desv. Est.	Prom. + 3 DS	M (µg/hisopo)
1	1,216	1,936	1,6	0,509	3,1	0,848
2	0,029	0,304	0,2	0,194	0,75	0,205
3	0	0	0	0	0	ND
4	2,367	2,02	2,2	0,245	2,93	0,801
5	0	0	0	0	0	0
6	0,454	0,356	0,4	0,069	0,61	0,167
7	0,688	0,714	0,7	0,018	0,76	0,206
8	0,693	0	0,3	0,49	1,82	0,497
9	0,674	0	0,3	0,477	1,77	0,483
10	0,861	0,9	0,9	0,027	0,96	0,263

ND : No detectable, valor menor al límite de detección

% Recuperación : 79,7

Estándar de concentración : 30,096 (µg/ml)

Áreas nm : 1383,589; 1379,388

Promedio : 1381,488 nm

Límite de aceptación : 17,12 (µg/hisopo)

Valor Máximo : 0,848 (µg/hisopo)

Anexo 20

Tabla 40. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Corrida 1	Corrida 2	Promedio	Desv.est	PROM + 3DS	M (µg/ml)	M (µg/ml)
0	0	0	0	0	0	ND

ND : No Detectable, valor menor al límite de detección
 Estándar concentración : 30,096 (µg/ml)
 Áreas nm : 1383,589; 1379,388
 Promedio : 1381,488nm
 M : cantidad de contaminante encontrado
 Límite de aceptación : 1,230 (µg/ml)

Anexo 21

Tabla 41. pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados (pH)
Blanco agua + Detergente	10,4
Blanco agua	7
Agua enjuague inicial	8,3
Agua enjuague final	7,1

Anexo 22

Tabla 42. Presencia de componentes de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados		
	Sulfato de sodio	Tripolifosfato de sodio	Lauril sulfato de sodio
Blanco agua + Detergente	↓ Blanco	↓ Amarillo	Espuma cte
Blanco agua	No ↓	No ↓	No Esp.
Agua enjuague inicial	No ↓	No ↓	No Esp.
Agua enjuague final	No ↓	No ↓	No Esp.

↓: Precipitado

Anexo 23

Tabla 43. Resultado de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Hisopón N°	Resultados (ufc/25 cm ²)					
	Mesofilos aerobios viables	Hongos y Levaduras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	≤ 50 ufc/25cm ²	≤ 30 ufc/25cm ²	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	10	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	20	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	10	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	5	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	5	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Anexo 24

Tabla 44. Resultado de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles Lote 2. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Sección fabricación	Resultados (ufc/ placa)	
	Mesófilos aerobios viables	Hongos y levaduras
	≤ 20 ufc/placa	≤ 10 ufc/placa
A	10	3
B	6	3
C	5	2
D	5	1

Anexo 25

Tabla 45. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado de superficies del reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Hisopo N°	Resultados					
	Corrida 1	Corrida 2	Promedio	Desv.Est.	Prom. + 3 DS	M (ug/hisopo)
1	2,517	2,714	2,615	0,14	3,034	0,768
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ND
3	2,023	2,097	2,060	0,052	2,215	0,561
4	2,008	1,799	1,903	0,148	2,347	0,594
5	2,435	2,540	2,488	0,074	2,711	0,687
6	1,743	1,952	1,848	0,148	2,291	0,580
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ND
8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ND
9	5,299	5,184	5,241	0,081	5,486	1,389
10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	ND

ND : No Detectable valor menor al límite de detección
 % Recuperación : 79,7
 Estándar de concentración : 31,600 (µg/ml)
 Áreas nm : 1559,619; 1571,754
 Promedio : 1565,687nm
 Límite de aceptación : 17,12 (µg/hisopo)
 Valor Máximo : 1,389 (µg/ml)

Anexo 26

Tabla 46. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en aguas de enjuague del reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Corrida 1	Corrida 2	Promedio	Desv. est.	PROM + 3DS	M (µg/ml)	M (µg/ml)
0	0	0	0	0	0	ND
ND		: No Detectable valor menor al límite de detección				
Estándar concentración		: 33,106 (µg/ml)				
Áreas nm		: 1604,873, 1639,028				
Promedio		: 1621,951nm				
M		: cantidad de contaminante encontrado				
Límite de aceptación		: 1,230 (µg/ml)				

Anexo 27

Tabla 47. pH en aguas de lavado en el reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 20.

Muestra	Resultados (pH)
Blanco agua + Detergente	10,2
Blanco agua	6,9
Agua enjuague inicial	8,3
Agua enjuague final	6,95

Anexo 28

Tabla 48. Presencia de componentes de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Muestra	Resultados		
	Sulfato de sodio	Tripolifosfato de sodio	Lauril sulfato de sodio
Blanco agua + Detergente	↓ Blanco	↓ Amarillo	Espuma cte
Blanco agua	No ↓	No ↓	No Esp.
Agua enjuague inicial	No ↓	↓ Amarillo	No Esp.
Agua enjuague final	No ↓	No ↓	No Esp.

↓ : Precipitado

Anexo 29

Tabla 49. Resultado de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Hisopo N°	Resultados (ufc/25 cm ²)					
	Mesófilos aerobios viables	Hongos y levaduras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	≤ 50 ufc/25cm ²	≤ 30 ufc/25cm ²	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	10	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	10	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	<5	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	<5	<5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Anexo 30

Tabla 50. Resultado de la contaminación microbiana en el área de fabricación de líquidos no estériles Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Sección fabricación	Resultados (ufc/ placa)	
	Mesófilos aerobios viables	Hongos y levaduras
	≤ 20 ufc/placa	≤ 10 ufc/placa
A	10	2
B	5	3
C	4	1
D	3	1

Anexo 31

Tabla 51. Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivo	Marco teórico	Hipótesis	Variables	Metodología
Validación del procedimiento de limpieza de equipos en el área de fabricación de líquidos en el Laboratorio Farmacéutico Markos. Lima, 2012.	¿Son válidos los procedimientos de limpieza aplicados a los equipos de fabricación del área de líquidos del Laboratorio Farmacéutico Markos?	<p>Objetivo general</p> <p>-Validar el procedimiento de limpieza aplicado a los equipos de fabricación del área de líquidos.</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>-Determinar la ausencia de contaminantes de origen químico luego de aplicar el método de limpieza.</p> <p>-Determinar la ausencia de contaminantes de origen físico luego de aplicar el método de limpieza.</p> <p>-Determinar la ausencia de contaminantes de origen microbiológico luego de aplicar el método de limpieza.</p>	<p>Conceptos generales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Buenas Prácticas de Manufactura - Aseguramiento de la Calidad - Validación - Aplicación de la Validación - Etapas de la Validación - Limpieza - Procesos de Limpieza - Grado de Limpieza - Evaluación de Limpieza - Tipos de Muestreo - Establecimiento del Límite de Aceptación - Validación de Limpieza - Procedimiento de Validación de Limpieza - Protocolo de Validación - Metodología Aplicada Al Peor Caso - Criterios de selección del Peor Caso - Procedimiento De Selección Del Peor Caso 	Los procedimientos de limpieza aplicados a los equipos del área de fabricación de líquidos del laboratorio farmacéutico Markos, son válidos.	<p>Variable independiente</p> <p>Procedimientos de limpieza aplicados a los equipos de fabricación del área de líquidos.</p> <p>Variable dependiente</p> <p>Validación de procedimientos de Limpieza.</p>	<p>Tipo de estudio</p> <p>Descriptivo -transversal</p> <p>Población</p> <p>Equipos del área de fabricación de líquidos no estériles.</p> <p>Muestra</p> <p>Reactor de 1500 l al que se aplicó previamente el método limpieza respectiva.</p> <p>Método de muestreo</p> <ul style="list-style-type: none"> -Selección del equipo prototipo. -Selección del producto prototipo y activo a monitorear. - Determinación de trazas del principio activo riboflavina 5 fosfato (producto prototipo). - Determinación de residuos del detergente. - Determinación de contaminación microbiana. -Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos. -Obtención de datos. -Análisis de datos.

VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE EQUIPOS EN EL ÁREA DE FABRICACIÓN DE LÍQUIDOS EN EL LABORATORIO FARMACÉUTICO MARKOS. LIMA 2012.

Rosales A, López S.

Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue validar el procedimiento de limpieza aplicado a los equipos de fabricación en el Área de Líquidos del Laboratorio Farmacéutico Markos, durante los meses de enero a julio de 2012, en la ciudad de Lima. Esta investigación es de tipo básica descriptiva y de diseño transversal. La muestra que se usó en el trabajo de investigación fue un reactor de 1500 l, a fin de confirmar y documentar que los resultados obtenidos durante la aplicación de estos métodos son confiables. Se establecieron la identificación de los elementos de limpieza, la definición del alcance de la prueba y los límites aceptables para el contaminante riboflavina 5 fosfato sódico, aplicando procedimientos de muestreo y métodos de análisis establecidos bajo criterios de aceptación aplicados a los tres lotes consecutivos. La selección del producto se hizo aplicando la metodología del peor caso, donde se asume que si el equipo queda limpio en las condiciones más desfavorables también se limpiará en las condiciones más favorables. En los tres lotes analizados se hallaron trazas de riboflavina 5 fosfato sódico equivalentes a 1,843; 0,848 y 1,389 $\mu\text{g}/\text{hisopo}$, respectivamente, los mismos que se encuentran dentro de las especificaciones permitidas establecidos para su control ($<17,12 \mu\text{g}/\text{hisopo}$). Se concluye que el procedimiento de limpieza aplicado al equipo es confiable, lo que garantiza su uso sea cual sea el orden en el que se fabriquen los productos

Palabras clave: validación, procedimiento de limpieza, peor caso.

SUMMARY

The main objective of this research was to validate the cleaning procedure applied to manufacturing equipment in the area of Pharmaceutical Liquids Laboratory Markos, during the months of January to July 2012 in the city of Lima. This basic research is descriptive and cross type design. The sample used in the research was a 1500 l reactor, in order to confirm and document that the results obtained during the application of these methods are reliable. Identification of the cleaning elements, defining the scope of the test and the acceptable limits for pollutant riboflavin 5 sodium phosphate, applying sampling procedures and analytical methods established under acceptance criteria applied to three consecutive batches were established. Product selection is made using the methodology worst case, where it is assumed that if the equipment is clean in the most unfavorable conditions also clean under the most favorable conditions. In all three batches analyzed trace 5 sodium riboflavin phosphate were found equivalent to 1,843; 0,848 and 1,389 $\mu\text{g}/\text{swab}$, respectively, the same that are within the permitted specifications established for control ($<17,12 \mu\text{g}/\text{swab}$). It is concluded that the cleaning procedure applied to the equipment is reliable, ensuring use whatever the order in which the products are manufactured.

Keywords: validation, cleaning procedure, worst case.

INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica mantener y alcanzar la calidad de los productos requiere de un programa de limpieza formal y consistente. La evolución de los conocimientos en el sector farmacéutico ha llevado a la introducción genérica de la validación de procedimientos de limpieza como requisito indispensable para asegurar la calidad de un producto, siendo así, ubicamos la validación de limpieza dentro de un sistema de garantía de calidad que nos permite demostrar con un alto grado de seguridad la fiabilidad que el siguiente lote 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 la reproducibilidad del proceso de fabricación, reconociendo los puntos críticos y asegurando el mantenimiento del perfil cualitativo del producto final. De acuerdo con el axioma de que "la calidad no se controla en un producto, la calidad se construye durante su fabricación". La calidad del medicamento se consigue desde la limpieza de sus equipos de fabricación en todos y cada uno de los pasos de su proceso de producción, desde su investigación hasta el último análisis sobre el producto final. La garantía de la calidad de un producto deriva de una cuidadosa y sistemática atención a todos aquellos factores que puede influir en su calidad: limpieza de los equipos de fabricación, selección de sus componentes y materiales, diseño de producto y proceso, adecuado control estadístico del proceso. El presente trabajo tuvo como propósito demostrar que con la aplicación del procedimiento de limpieza al reactor de 1500 l, se logra reducir las trazas de activos, detergente y microorganismos que pueden generar contaminación al momento de la fabricación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

Equipos de fabricación del área de líquidos no estériles del Laboratorio Farmacéuticos Markos S.A

Muestra

Reactor de 1500 l, al que se aplicó previamente el método de limpieza respectivo.

Determinación de trazas del principio activo riboflavina 5 fosfato (producto prototipo)

Se usó la metodología analítica de determinación de riboflavina 5 fosfato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), validada en cuanto a especificidad y

selectividad, linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad por el Comité de Validación de Laboratorio.

Determinación de residuos del detergente

Análisis cualicuantitativo de sulfato de sodio, tripolifosfato de sodio y lauril sulfato de sodio.

Determinación de la contaminación microbiana de superficies

En el área de microbiología se procedió a sembrar por el método de incorporación en el medio nutritivo Agar tripticosa soya.

Se incubó la placa invertida a 35°C - 37°C por 24 a 48 horas para recuento de mesófilos aerobios viables y se incubó a 25°C ± 5°C por cinco a siete días para recuento de hongos y levaduras.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procede a realizar el recuento de las ufc. Se realizan los cálculos y expresan los resultados en ufc/cm².

Se realizó el análisis microbiológico del agua de enjuague: recuento microbiano y descarte de la presencia de coliformes y microorganismos patógenos. Según la técnica de análisis de aguas de la USP 31. El ensayo se hizo por triplicado y se expresan como ufc/ml.

Cálculo del límite de detección y cuantificación

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

- Se obtuvo otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, a concentraciones de 0,3; 0,9 y 1,5 µg/ml, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapoló la respuesta a concentración cero (Y_{bl}).
- Se determinó la desviación estándar (S) de cada concentración de la nueva curva de calibración.
- Se efectuó el análisis de regresión tomando como X a la concentración y la desviación estándar como Y.
- Se extrapoló la desviación estándar del blanco.

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

Determinación del porcentaje de recuperación

Se determinó el porcentaje de recuperación del método de muestreo en combinación con el método analítico. Siendo el valor de R superior al 50 %.

- Se preparó una solución de concentración 50 µg/ml.
- Se tomó 100.µl y “ensuciar” 25 cm² de una superficie similar al equipo, se dejó secar.
- Se realizó el muestreo de la superficie y reposó por 30 minutos, se sonicó por 10 minutos y agitó con ayuda del vórtex por un minuto.
- Se filtraron las muestras e inyectaron por triplicado.
- Se repitió este ensayo con tres muestras.
- El porcentaje de recuperación se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$C_{hallada} = \frac{A_{MP}}{A_{St}} \times C_{St}$$

Donde:

C_{hallada}: Concentración en µg/ml hallados

A_{mp}: Área muestra

A_{St}: Área del estándar

C_{St}: Concentración del estándar (µg/ml)

$$\% R = \frac{C_{hallado}}{C_{agregado}} \times 100$$

Donde:

% R: Porcentaje de recuperación

C_{hallado}: Área muestra (µg/ml)

C_{agregado}: Área del estándar (µg/ml)

Análisis de datos

Análisis de varianza a un nivel de significancia del 95 % de las cantidades de residuos de principio activo en el equipo.

RESULTADOS

Tabla 1. Trazas de riboflavina 5 fosfato sódico por hisopado con un límite de aceptación de 17,12 (µg/hisopo) de superficies del reactor de 1500.l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Punto de muestreo	Resultado (µg/hisopo)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1 Hélice inferior izquierda	1,843	0,848	0,768
2 Hélice inferior media	0,805	0,205	ND
3 Hélice inferior derecha	0	ND	0,561
4 Hélice superior media	ND	0,801	0,594
5 Hélice superior derecha	ND	0	0,687
6 Hélice superior izquierda	ND	0,167	0,58
7 Eje central	0,514	0,206	ND
8 Parte interna del visor	1,119	0,497	ND
9 Parte media tapa del visor	0,797	0,483	1,389
10 Fondo del reactor	0,87	0,263	ND

Tabla 2. Resultados de componente de detergente en aguas de enjuague en el reactor de 1500.l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Componente del detergente	Resultado*		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Sulfato de sodio	No ↓	No ↓	No ↓
Tripolifosfato	No ↓	No ↓	No ↓
Lauril sulfato	No Esp.	No Esp.	No Esp.

*Especificación: No ↓, No Esp.

Tabla 3. Resultados de la contaminación microbiana en superficies del reactor de 1500 l. Lote 1, Lote 2, Lote 3. Laboratorios Farmacéuticos Markos S.A. Lima, 2012.

Punto de muestreo	Resultado (ufc/25 cm ²)*					
	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.	Mesófilos aerobios	Hongos y Lev.
1	20	5	10	5	10	5
2	30	5	20	5	10	5
3	10	5	10	5	5	5
4	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5
6	10	5	5	5	5	5
7	5	5	5	5	5	5
8	5	5	5	5	5	5
9	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	5
	Patógenos: Ausente		Patógenos: Ausente		Patógenos: Ausente	

DISCUSIÓN

Para iniciar la validación de los métodos de limpieza se realizó la selección del producto prototipo en función a la filosofía del “peor caso”, asumiendo que si el equipo queda limpio en las condiciones más desfavorables, quedará limpio en las condiciones más favorables. El principio activo riboflavina 5 fosfato sódico fue elegido como “peor caso” del grupo de productos fabricados en los equipos.

Para el análisis de trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en los equipos se realizó previamente la elección del hisopo a emplear, eligiendo el hisopo industrial debido a que no presenta interferencias, ya que en las condiciones de análisis se detecta un pico con tiempo de retención diferente al de la riboflavina 5 fosfato sódico, el que se debe probablemente al material adhesivo usado para la elaboración de los hisopos según señala Zayas.¹

El límite de cuantificación y detección se relacionan con la cantidad de analitos requerida para dar un resultado significativo cualitativo o cuantitativo, el límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que pueda ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas y el límite de cuantificación es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. La determinación del límite de cuantificación es laboriosa por lo que solo se efectúa cuando el nivel inferior del rango del método analítico se acerca a los límites de detección y cuantificación como es el caso de impurezas y productos de degradación USP25.² Como resultado de la determinación de los límites de detección y cuantificación se obtuvo la ecuación de la recta en la que se demuestra que existe una correlación lineal entre la concentración del analito y las áreas, como se demuestra en tabla 13 y figura 1. Como se observa en la tabla 15 se obtuvo un límite de detección de 0,066017.µg/ml y un límite de cuantificación de 0,209602.µg/ml cumpliendo con el criterio de que los límites de detección y cuantificación deben ser menores a los límites de limpieza establecidos para los equipos como lo detalla Beneites.³ Además comparando estos límites con los obtenidos por Martínez⁴ en un trabajo de investigación similar a este, se demuestra la alta sensibilidad del método de análisis, haciendo factible su uso para fines de validación de métodos de limpieza.

Por otra parte, la eficiencia del hisopado fue determinada mediante el estudio de recuperación. El porcentaje de recuperación promedio obtenido en el estudio fue de 79,70%, que se encuentran dentro de los límites establecidos normalmente comprendidos entre 50 y 100 % según la AEFI⁵, o mayores al 60 % según Laughlin.⁶ El porcentaje de recuperación es usado para correlacionar la cantidad hallada con la cantidad real presente en las superficies del equipo. El porcentaje de recuperación además de demostrar la exactitud del método analítico proporciona información sobre la eficacia de la extracción de trazas de las fibras del hisopo.

Para el control analítico de trazas de riboflavina 5 fosfato sódico en los equipos por motivos de seguridad se hizo uso del método del hisopado, siendo este el método más aconsejable según la FDA.⁷

Las trazas encontrados en los 10 puntos de muestreo del reactor de 1500.l individualmente

se encuentran dentro de los límites establecidos, asimismo las trazas de riboflavina 5 fosfato sódico más altos encontrados en el reactor de 1500.l, mediante este método fueron de 1,843; 0,848 y 1,389 (µg/hisopo) como se detalla en la tabla 18, en los tres lotes, respectivamente, estando estos dentro del límite especificado permitido menor a 17,12 µg/hisopo. De estos resultados se puede determinar que los puntos más críticos son: hélice inferior izquierda y parte media de la tapa del visor debiéndose poner especial cuidado durante la limpieza de estas zonas. Cabe señalar que si el componente no es detectado no quiere decir que el contaminante no esté presente después del proceso de limpieza, sino que se encuentra en niveles de concentración inferior a los límites de detección y cuantificación del método analítico según lo detalla Martínez.⁴

El método del enjuague fue utilizado en el reactor de 1500.l, debido a que permite cubrir enteramente la superficie del equipo llegando a zonas en las que los hisopos no pueden llegar, se utilizó el volumen de líquido de enjuague mínimo cuidando de no diluir la muestra en exceso. En los análisis de aguas de enjuague del reactor de 1500 l, en los tres lotes demostraron una contaminación de ND, por debajo del límite establecido de 1,230 (µg/ml). Por otra parte, en la determinación de restos de detergente en el equipo reactor de 1500 l, según se muestra en la tabla 2, se observa que para el enjuague final del equipo hay ausencia de los componentes del detergente en los tres lotes y que el pH del agua del lavado final del equipo se encuentra dentro de los límites de aceptación.

Asimismo, la determinación de la contaminación microbiológica en el equipo, así como el análisis de las aguas de lavado y el control de los ambientes de fabricación, fueron satisfactorios encontrándose los resultados dentro de los límites especificados, como se muestra en las Tabla 3.

Teniendo en cuenta que los resultados de los análisis se encuentran dentro de los límites establecidos para su control, los métodos de limpieza aplicados a los equipos son confiables y se garantiza su uso sea cual sea el orden en el que se fabriquen los productos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zayas L. Curso de prácticas actualizadas de validación en la industria farmacéutica. Lima: RaytheonEngineer-Constructors; 1998.
2. United States Pharmacopeia 25. National

- Formulary 20. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. Toronto Canada 2002. Pp.1982-1989.
3. Beneites E. Good Manufacturing Practices. Madrid: Centro de Estudios Superiores de la Industria Farmacéutica; 1996.
 4. Martínez L, García L, Pérez N, Chang A. Determinación de trazas de lidocaína y epinefrina en el proceso de limpieza posterior a la fabricación de carpules. Revista Cubana de Farmacia [revista en internet] 2001 [acceso 20 enero de 2012]; 35(2):100-103. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475152001000200004&script=sci_arttext
 5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, AEFI. Validación de métodos de limpieza. Sección Catalana. Barcelona: Anagrafic; 1994.
 6. Laughlin M. Pharmaceutical cleaning validation method references 2001.
 7. Food and Drug Administration, FDA. [base de datos en internet]; 2000-[acceso 20 de mayo de 2012] Disponible en: http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/valis.html_23k.journals.org/jmpr/pdf/pdf2008/October/Naveen%20et%20al.pdf.