



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

“CONTROL DE UN ATRIBUTO CRÍTICO DE LA CALIDAD EN  
PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACÉUTICOS MEDIANTE EL  
MONITOREO DE IMPUREZAS ELEMENTALES CONFORME A LA  
USP <232> Y <233>”

## TRABAJO TERMINAL DE GRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CALIDAD AMBIENTAL**

PRESENTA:

**Q I PENELOPE ANTINEA ARIZA LORENZANA**

DIRIGIDA POR:

M. en C. María Magdalena García Fabila

Dr. Juan Carlos Sánchez Meza

Dra. en C. María de la Luz Reyes Reyes



TOLUCA, MÉXICO

ABRIL, 2016



**UAEM** | Universidad Autónoma  
del Estado de México

OFICIO NO 109/2016

Toluca, México, 29 de febrero de 2016

**P. DE MAESTRIA EN CALIDAD AMBIENTAL  
PENÉLOPE ANTINEA ARIZA LORENZANA  
FACULTAD DE QUIMICA  
P R E S E N T E**

El que suscribe Director de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Juan Carlos Sánchez Meza  
**PRESIDENTE**

M. en C.A. María Magdalena García Fabila  
**SECRETARIO**

Dra. María de la Luz Reyes Reyes  
**PRIMER VOCAL**

M. en I. Víctor Francisco Pacheco Salazar  
**SEGUNDO VOCAL**

M. en A. Alicia Reyes García  
**TERCER VOCAL**

Dra. Edith Erielia Gutiérrez Segura  
**SUPLENTE**

M. en C. Jesús Alfredo Lievanos Barrera  
**SUPLENTE**

**FIRMA**

**ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**  
"2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"

**DR. EN I. CARLOS EDUARDO BARRERA DÍAZ  
DIRECTOR**



**U. A. E. M.  
FACULTAD DE QUIMICA  
DIRECCION**



[www.uaemex.mx](http://www.uaemex.mx)

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México  
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • [fquim@uaemex.mx](mailto:fquim@uaemex.mx)

ESTE PROYECTO QUEDO REGISTRADO CON EL SIGUIENTE  
CÓDIGO:

**MA-CAAM-0214**

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN:

- EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE  
SIGNA S. A. DE C. V.

## RESUMEN

En la industria farmoquímica, las trazas de impurezas metálicas elementales (IE), son un riesgo toxicológico por sí mismas y deben ser controladas atendiendo a las buenas prácticas de manufactura, para asegurar que los principios activos cumplan con los requisitos de seguridad y con las características de calidad y pureza que les son especificadas para poder vender los productos a otros países.

Por esta razón, con un enfoque tecnológico, social, económico y ambiental se propuso desarrollar una metodología general para el análisis de las posibles impurezas elementales presentes en los API's para asegurar el cumplimiento del producto de acuerdo a la ICH Q3D<sup>12</sup> previo a la implementación del proceso.

Se desarrollaron y validaron métodos analíticos generales mediante la técnica de ICP-MS para la cuantificación de IE Clase 1, Clase 2A y Clase 2B para los productos desarrollados y producidos en la empresa farmoquímica. Los resultados demostraron que los productos cumplen con el atributo de calidad establecido para el contenido de impurezas elementales a los niveles establecidos por las guías ICH, lo cual implica que el producto puede continuar en el mercado y cumple con los más altos estándares de calidad.

La aplicación de estos métodos a un producto que se desarrolla en la empresa farmoquímica nos permite ver la funcionalidad de este tipo de cuantificación en las diferentes etapas del proceso aplicando herramientas como el manejo del riesgo de la calidad para determinar las etapas críticas del proceso y la utilización de espacios de diseño para un mejor control de las pruebas a realizar.

## ABREVIATURAS

RAE	Real Academia Española
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
EMA	Agencia Europea de Evaluación de los Medicamentos
ICH	Conferencia Internacional sobre Armonización
API	Ingrediente Activo Farmacéutico
GMP	Buenas Prácticas de Manufactura
PDE	Exposición Diaria Permitida
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
ICP-AES	Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Inductivamente Acoplado
ICP-MS	Espectrofotómetro de emisión de plasma inductivamente acoplado
ppm	Partes por millón
µg/g	Microgramos por gramo
µg/día	Microgramos por día
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades
DER	Desviación Estándar Relativa
I&D	Investigación y Desarrollo
NF	Formulario Nacional
LOAEL	Nivel más bajo de efecto adverso observado
NOAEL	Nivel de efecto adverso no observado
LOEL	Nivel más bajo de efecto observado
NOEL	Nivel de efecto no observado
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
NTP	Nota Técnica de Prevención
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppt	Partes por Trillón
Pa	Pascal

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres**

**Moisés y Josefina** que son las personas más importantes para mí y siempre me han apoyado y estado en todas y cada una de las etapas de mi vida

### **A mis abuelos**

**Amalia y Pedro** que siempre me brindaron su cariño y me apoyaron para la realización de todos mis proyectos

### **A mis hermanos y sobrinos**

En especial a **Paola y Andrea**

### **A mis compañeros y amigos de la maestría y del trabajo**

Por su apoyo y confianza, **Ricardo, Griselda, Carla y Jessy**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Signa S.A. de C.V.**

En especial al **Ing. OSCAR VIVANCO** por la creación e impulso al programa de maestrías para el desarrollo personal, profesional y laboral de las personas

### **A la Dra. Maria de la Luz Reyes**

Por la confianza, la motivación, el apoyo, las aportaciones, asesorías y el tiempo dedicado para que se realizará exitosamente el trabajo.

### **Al Dr. Jose Miguel Lazcano**

Por el apoyo y confianza para realización de este proyecto

### **Alan Sabdiel Ruiz Ruiz**

Por sus ideas para desarrollar el presente trabajo

### **A Elena Castellanos, Angel Contreras**

Por los resultados y aportaciones realizadas al proyecto

### **A LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

En especial a la **M. en C. María Magdalena García**, al **Dr. Juan Carlos Sánchez** y a la **M. en A. Alicia Reyes** por su apoyo, asesoría y aportaciones durante el desarrollo y realización de este proyecto

### **Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)**

Por el apoyo para la realización de este proyecto

## Contenido

RESUMEN .....	v
DEDICATORIAS .....	vii
LISTADO DE TABLAS .....	xi
LISTADO DE FIGURAS .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Impurezas Elementales.....	3
2.2. Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH).....	3
2.2.1. Directriz de seguridad .....	5
2.2.2. Directriz de eficacia.....	5
2.2.3. Directriz multidisciplinaria.....	5
2.2.4. Directriz de calidad.....	5
2.2.4.1. ICH Q2 Validación analítica <sup>10</sup> .....	6
2.2.4.2. ICH Q8 Desarrollo Farmacéutico <sup>2</sup> .....	9
2.2.4.3. ICH Q9 Manejo del riesgo de la calidad <sup>11</sup> .....	10
2.2.4.4. ICH Q3 Impurezas <sup>12</sup> .....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
4. OBJETIVO GENERAL.....	22
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
5. METODOLOGÍA.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
6.1. Desarrollo de métodos analíticos .....	27
6.2 Toxicidad de las impurezas elementales <sup>12</sup> .....	29

6.3 Resultados de la validación de los métodos analíticos .....	31
6.4 Resultados de la identificación de las posibles fuentes de impurezas elementales en el proceso de fabricación de un API para asegurar que el producto cumpla con el requerimiento regulatorio .....	35
7. CONCLUSIONES.....	38
8. REFERENCIAS.....	39
ANEXO A.- MARCO JURÍDICO .....	43
ANEXO B. REPORTE DE VALIDACIÓN IMPUREZAS ELEMENTALES CLASE 1 .....	51
ANEXO C. REPORTE DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS ELEMENTALES CLASE 2A POR ICP-MS .....	65
ANEXO D. REPORTE DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PALADIO POR ICP-MS .....	78
ANEXO E. TOXICOLOGÍA <sup>12</sup> .....	88
ANEXO F.- TÉCNICA ANALÍTICA ICP-MS <sup>20, 21, 22, 23</sup> .....	103

## LISTADO DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 2.1	Directrices de calidad	6
Tabla 2.2	Exposición diaria máxima permisible en $\mu\text{g}/\text{día}$	17
Tabla 2.3	Exposición diaria máxima permisible en ppm ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	18
Tabla 5.1	Especificación vigente para las impurezas elementales	23
Tabla 5.2	Criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos utilizados en la empresa farmoquímica	25
Tabla 5.3	Criterios para la validación de métodos conforme a la USP para procedimientos cuantitativos	25
Tabla 5.4	Resultados iniciales obtenidos del monitoreo de las diferentes impurezas elementales	26
Tabla 6.1	Especificación de las impurezas elementales para el API estudiado	27
Tabla 6.2	Información toxicológica de las impurezas elementales analizadas	29
Tabla 6.3	Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de Impurezas Elementales clase 1	32
Tabla 6.4	Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de Impurezas Elementales clase 2A	33
Tabla 6.5	Resultados obtenidos de la validación del método para la determinación de Pd	34
Tabla 6.6	Evaluación de contenido de Pd en las diferentes etapas del proceso del API	36
Tabla 6.7	Pruebas preliminares del contenido de paladio en las diferentes etapas del API	36
Tabla 6.8	Eficiencia de eliminación del paladio	37
Tabla A.1	Marco Jurídico del proyecto	44
Tabla B.I.1.	Resultados de la idoneidad del sistema para la clase 1	51

Tabla B.II.1.	Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar Stock Clase 1	52
Tabla B.II.2.	Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar de Trabajo Clase 1	53
Tabla B.II.3	Resultados de la Estabilidad de la Solución Muestra	53
Tabla B.III.1	Resultados de la Linealidad de la respuesta para As	54
Tabla B.III.2	Resultados de la Linealidad de la respuesta para Cd	55
Tabla B.III.3	Resultados de la Linealidad de la respuesta para Hg	56
Tabla B.III.4	Resultados de la Linealidad de la respuesta para Pb	57
Tabla B.IV.1	Resultados del Límite de Cuantificación para la clase 1	58
Tabla B.V.1	Resultados del Límite de Detección para clase 1	58
Tabla B.VI.1	Resultados de la prueba de Exactitud para la clase 1	59
Tabla B.VII.1	Resultados de la prueba de Repetibilidad para clase 1	62
Tabla B.VII.2	Resultados de la prueba de Precisión Intermedia para clase 1	62
Tabla B.VII.3	Resultados de la evaluación de la Precisión para la clase 1	62
Tabla B.VIII.1	Rango para la clase 1	63
Tabla B.IX.1.	Parámetros evaluados para la prueba de robustez clase 1	63
Tabla B.IX.2.	Resultados del estudio de robustez de la clase 1	64
Tabla C.I.1	Resultados de la Idoneidad del sistema para la clase 2A	65
Tabla C.II.1	Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar Stock para la clase 2A	66
Tabla C.II.2	Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar de Trabajo para la clase 2A	67
Tabla C.II.3	Resultados de la Estabilidad de la Solución Muestra	67
Tabla C.III.1	Resultados de la Linealidad de la respuesta para V	68
Tabla C.III.2	Resultados de la Linealidad de la respuesta para Co	69
Tabla C.III.3	Resultados de la Linealidad de la respuesta para Ni	70
Tabla C.IV.1	Resultados del Límite de Cuantificación para clase 2A	71

Tabla C.V.1	Resultados del Límite de Detección para clase 2A	71
Tabla C.VI.1	Resultados de la prueba de Exactitud para la clase 2A	72
Tabla C.VII.1	Resultados de la prueba de Repetibilidad para la clase 2A	74
Tabla C.VII.2	Resultados de la prueba de Precisión Intermedia para la clase 2A	75
Tabla C.VII.3	Evaluación de la Precisión para clase 2A	75
Tabla C.VIII.1	Rango	75
Tabla C.IX.1.	Parámetros evaluados para la prueba de Robustez clase 2A	76
Tabla C.IX.2.	Resultados del estudio de Robustez de la clase 2A	77
Tabla D.I.1	Resultados de la Idoneidad del sistema para Pd	78
Tabla D.II.1	Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar Stock para la clase 2A	79
Tabla D.II.2	Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar de Trabajo para la clase 2A	80
Tabla D.II.3	Resultados de la Estabilidad de la Solución Muestra	80
Tabla D.III.1	Resultados de la Linealidad de la respuesta para Pd	81
Tabla D.IV.1	Resultados del Límite de Cuantificación para Pd	82
Tabla D.V.1	Resultados del Límite de Detección para Pd	82
Tabla D.VI.1	Resultados de la prueba de Exactitud para Pd	83
Tabla D.VII.1	Resultados de la prueba de Repetibilidad para Pd	85
Tabla D.VII.2	Resultados de la prueba de Precisión Intermedia para Pd	85
Tabla D.VII.3	Evaluación de la Precisión para Pd	85
Tabla D.VIII.1	Rango	86
Tabla D.IX.1.	Parámetros evaluados para la prueba de Robustez	86
Tabla D.IX.2.	Resultados del estudio de Robustez de la clase 2A	87

## LISTADO DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Estructura general de la ICH	4
Figura 2.2	Proceso general del manejo de riesgo de la calidad	12
Figura 2.3	Clasificación de las impurezas elementales de acuerdo a la guía ICHQ3D	15
Figura 5.1	Proceso general del API estudiado	26
Figura 6.1	Proceso del API en estudio	35
Figura A.1.	Pirámide legislativa	43
Figura B.III.1	Resultados de la linealidad de la respuesta para As	54
Figura B.III.2	Resultados de la linealidad de la respuesta para Cd	55
Figura B.III.3	Resultados de la linealidad de la respuesta para Hg	56
Figura B.III.4	Resultados de la linealidad de la respuesta para Pb	57
Figura C.III.1	Resultados de la linealidad de la respuesta para V	68
Figura C.III.2	Resultados de la linealidad de la respuesta para Co	69
Figura C.III.3	Resultados de la linealidad de la respuesta para Ni	70
Figura D.III.1	Resultados de la linealidad de la respuesta para Paladio	81
Figura F.1	Elementos analizados mediante la técnica de ICP-MS	104

## 1. INTRODUCCIÓN

Según la Real Academia Española (RAE), la **calidad** se define como la adecuación de un producto o servicio a las características o atributos especificados<sup>1</sup>.

Un atributo es cada una de las cualidades o propiedades de un producto o servicio. Cuando hablamos de un **atributo crítico de la calidad** nos referimos a las características del producto que tienen un impacto en la calidad y que deben ser estudiadas y controladas. Pueden ser propiedades o características físicas, químicas, biológicas o microbiológicas que deban mantenerse dentro de un límite, rango o distribución apropiado, para asegurar la calidad del producto deseada.<sup>2</sup>

Algunos de los principales atributos de calidad de un fármaco o de un medicamento son: identidad, potencia, pureza, eficacia, estabilidad y seguridad.<sup>3</sup> Una calidad deficiente puede dejar al medicamento sin efecto terapéutico y puede ocasionar reacciones adversas o tóxicas; éstas, a su vez, pueden producir daños a los pacientes (prolongando su enfermedad o induciendo un problema de salud nuevo), además de malgastar recursos limitados.<sup>4</sup>

Los atributos de la calidad pueden verse afectados por el proceso de fabricación, el envasado, el almacenamiento y otros factores. Por ello, en la actualidad, el aseguramiento de la calidad es un concepto absoluto: la calidad es una sola y se debe lograr mediante normas y procedimientos que se ejecutan y exigen con rigor.

El aseguramiento de la calidad de los medicamentos abarca a investigación y desarrollo, producción, control de calidad, almacenamiento, distribución, farmacovigilancia e información al profesional que prescribe y la información proporcionada al paciente.<sup>5</sup>

Ejemplo de entidades que se encargan del aseguramiento de la calidad de los medicamentos son: la FDA (Food and Drug Administration), en Estados Unidos, la Agencia Europea de Evaluación de los Medicamentos (EMA), y una entidad armonizadora, que es la **ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)**<sup>5</sup>

Para asegurar la calidad de los medicamentos y de los fármacos o Principios Activos Farmacéuticos **APIs**, (por sus siglas en inglés *Active Pharmaceutical Ingredient*), uno de los atributos críticos que se deben de monitorear cuidadosamente son las impurezas durante el desarrollo del proceso, la optimización y la transferencia. El análisis de impurezas elementales, en especial los elementos de mayor toxicidad (As, Cd, Hg y Pb) y otros están fuertemente regulados por legislaciones internacionales,<sup>6</sup> como las anteriormente mencionadas, y también por las legislaciones nacionales (información detallada en **Anexo A**) debido a que estas impurezas pueden ser dañinas a la salud humana en muy bajas concentraciones.

En el presente trabajo se aborda la estrategia para asegurar que los API's producidos en la empresa farmoquímica cumplan en su totalidad con los requerimientos de las agencias regulatorias nacionales e internacionales, en cuanto al atributo de calidad establecido en el ámbito de impurezas elementales. Ésta estrategia aborda desde la aprobación de materias primas, el seguimiento de las diversas etapas de la producción y la verificación del producto terminado.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### ***2.1. Impurezas Elementales***

Las trazas de impurezas metálicas elementales son un riesgo toxicológico por sí mismas y deben ser controladas atendiendo a las buenas prácticas de manufactura (GMP's), para asegurar que los principios activos cumplan con los requisitos de seguridad y con las características de calidad y pureza que les son especificadas. Por otro lado, este tipo de impurezas puede disminuir la estabilidad y acortar la vida del API. Por esta razón entidades como la FDA, EMEA e ICH, advierten que estos problemas de contaminación deben ser completamente investigados de forma periódica.<sup>6</sup>

### ***2.2. Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH).***

La ICH es una entidad armonizadora que reúne a las autoridades reguladoras de Japón, Estados Unidos (FDA), la Unión Europea (EMA) y Canadá, y que junto con la industria farmacéutica de investigación, generan una serie de pautas y orientaciones dirigidas a optimizar la calidad de los medicamentos, en aspectos que van desde la investigación y el desarrollo de fármacos, hasta guías sobre buenas prácticas de manufactura.<sup>7</sup>

Desde su creación en 1990, la ICH ha evolucionado gradualmente, para responder cada vez más de manera global sobre el desarrollo de fármacos. La misión de la ICH es lograr una mayor armonización en todo el mundo para asegurar la seguridad, eficiencia y alta calidad de medicamentos desarrollados y registrados utilizando los recursos de la manera más eficiente.<sup>8</sup> La estructura general de la ICH y el enfoque del presente trabajo se muestra en la Figura 2.1.

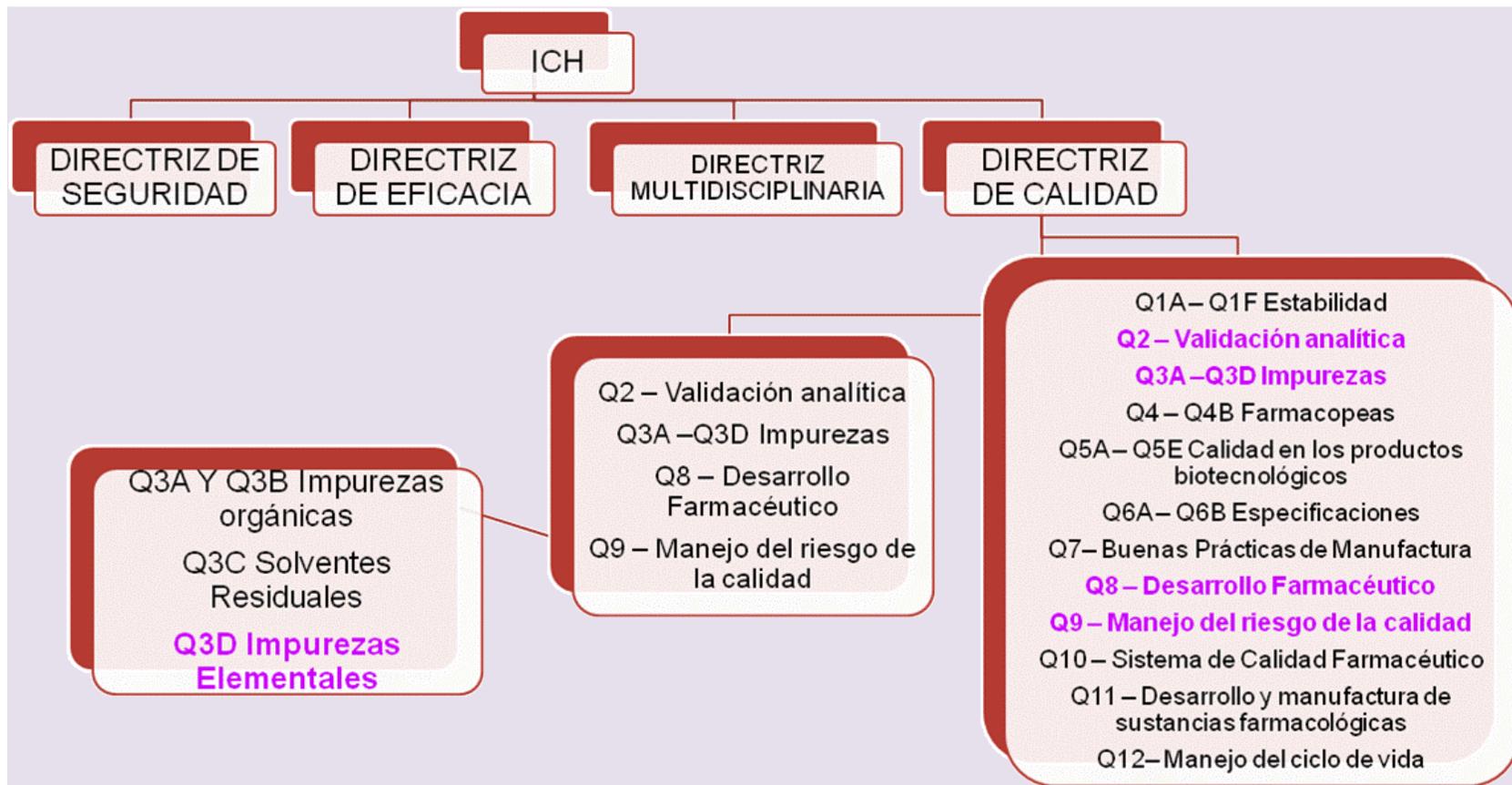


Figura 2.1 Estructura general de la ICH (Fuente: elaboración propia con información de la página oficial de la ICH)

Los temas de la ICH se dividen en cuatro categorías y se asignan de acuerdo a las siguientes directrices.<sup>9</sup>

### **2.2.1. Directriz de seguridad**

La ICH ha producido un amplio conjunto de directrices de seguridad para descubrir riesgos potenciales como la carcinogenicidad, genotoxicidad y toxicidad para la reproducción.

### **2.2.2. Directriz de eficacia**

El trabajo realizado por ICH bajo el título La eficacia tiene que ver con el diseño, la realización, la seguridad y el informe de los ensayos clínicos. También cubre nuevos tipos de medicamentos derivados de procesos biotecnológicos y el uso de la farmacogenética con técnicas de genómica para producir medicamentos más específicos.

### **2.2.3. Directriz multidisciplinaria**

Esos son los temas transversales que no encajan de forma única en una de las categorías de Calidad, Seguridad y de eficacia. Incluye la terminología médica ICH (MedDRA), el Documento Técnico Común (CTD) y el desarrollo de estándares electrónicos de Transferencia de Información Regulatoria (ESTRI).

### **2.2.4. Directriz de calidad**

Logros de armonización en el área de Calidad incluyen hitos fundamentales tales como la realización de estudios de estabilidad, que definen los umbrales pertinentes para las pruebas de impurezas y un enfoque más flexible a la calidad farmacéutica basado en Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) de gestión de riesgos. Dentro de las **directrices de calidad** se desprenden las siguientes guías mostradas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Directrices de calidad

Guía	Tópico
Q1A – Q1F	Estabilidad
Q2	Validación analítica
Q3A –Q3D	Impurezas
Q4 – Q4B	Farmacopeas
Q5A – Q5E	Calidad en los productos biotecnológicos
Q6A – Q6B	Especificaciones
Q7	Buenas Prácticas de Manufactura
Q8	Desarrollo Farmacéutico
Q9	Manejo del riesgo de la calidad
Q10	Sistema de Calidad Farmacéutico
Q11	Desarrollo y manufactura de sustancias farmacológicas
Q12	Manejo del ciclo de vida

El presente trabajo se enfoca principalmente en las guías Q2 Validación analítica, Q3 Impurezas, Q8 Desarrollo farmacéutico y Q9 Manejo de riesgo de la calidad.

#### 2.2.4.1. ICH Q2 Validación analítica <sup>10</sup>

Describe la validación de los procedimientos, presenta una descripción sobre las características que se deben de considerar durante la validación de los procedimientos analíticos. El objetivo es demostrar que los procedimientos analíticos son adecuados para el propósito previsto.

Los tipos de procedimientos a ser validados son cuatro: pruebas de identificación, pruebas cuantitativas para el control de impurezas, pruebas límite para el control de impurezas y pruebas cuantitativas de la fracción activa en el fármaco (ensayo).

Las pruebas de identificación tienen por objeto garantizar la identidad de un analito en una muestra. Esto se consigue normalmente mediante la comparación de una propiedad de la muestra (por ejemplo, espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) con la de un patrón de referencia.

Las pruebas para impurezas pueden ser cuantitativas o de límite para la impureza en una muestra. De cualquier manera esta prueba está diseñada para reflejar con

precisión las características de pureza de la muestra. Se requieren diferentes características de validación para una prueba cuantitativa y para una de ensayo límite.

En los procedimientos de ensayo se pretende medir el analito presente en una determinada muestra. El ensayo representa una medición cuantitativa del componente principal en la sustancia farmacológica.

El objetivo del procedimiento analítico debe entenderse claramente para determinar cuáles parámetros deben ser evaluados. Los parámetros evaluados más comunes son los siguientes: exactitud, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango.

**Procedimiento analítico:** Se refiere a la forma en que va a ser llevado el análisis, se deben de describir a detalle los pasos a seguir para ejecutar la prueba. Este puede incluir, pero no se limita a: la muestra, estándares de referencia, la forma de preparación de los reactivos, uso de equipos, preparación de curvas de calibración, uso de fórmulas para los cálculos, etc.

**Especificidad:** Es la capacidad para asignar inequívocamente un analito en presencia de componentes que se espera estén presentes, como pueden ser impurezas, productos de degradación, matriz de la solución, etc.

**Exactitud:** La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta (convencionalmente considerado como verdadero o el valor de referencia aceptado) y el valor encontrado.

**Precisión:** La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

**Repetibilidad:** Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.

**Precisión intermedia:** Expresa las posibles variaciones que pueden ocurrir dentro de un mismo laboratorio, días diferentes, analistas diferentes, equipos diferentes, etc.

**Reproducibilidad:** Expresa la precisión entre laboratorios.

**Límite de detección:** El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

**Límite de cuantificación:** El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en la muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud.

**Linealidad:** La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad del método analítico (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales con la concentración del analito en la muestra.

**Rango:** El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración más baja y más alta del analito en la muestra, y para los cuales, ha sido demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión exactitud y linealidad.

**Robustez:** La robustez de un procedimiento analítico es la medida de la capacidad de permanecer sin ser afectado por pequeñas o deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona un indicio de su confiabilidad durante su uso normal.

La revalidación de los procedimientos analíticos debe ser llevada a cabo cuando haya un cambio significativo en la síntesis del API, cambios en la composición del producto terminado y cambios en el procedimiento analítico.

#### **2.2.4.2. ICH Q8 Desarrollo Farmacéutico <sup>2</sup>**

La sección de Desarrollo Farmacéutico ofrece la oportunidad de presentar los conocimientos adquiridos mediante la aplicación de métodos científicos y el riesgo en el manejo de la calidad (por definición, ver ICH Q9) para el desarrollo de un producto y su proceso de manufactura.

La sección de desarrollo farmacéutico está destinada a proporcionar una amplia comprensión del proceso y fabricación de productos para los colaboradores e inspectores

El objetivo del desarrollo farmacéutico es diseñar un producto de calidad y su proceso de fabricación para entregar consistentemente un rendimiento previsto del producto. La información y los conocimientos adquiridos en el desarrollo farmacéutico, estudios y experiencia en la fabricación proporcionan la comprensión científica para apoyar el establecimiento del espacio de diseño, especificaciones y controles de proceso.

La información de los estudios de desarrollo farmacéutico puede ser una base para la gestión en el manejo de riesgo de la calidad. Es importante destacar que la calidad no puede ser probada en productos debe ser construida en el diseño. Los cambios en la formulación y fabricación durante el proceso de desarrollo y la gestión del ciclo de vida deben ser considerados como oportunidades para adquirir conocimientos adicionales y establecer además el apoyo del espacio de diseño.

El espacio de diseño es propuesto por el solicitante y está sujeto a la evaluación y aprobación de las agencias reguladoras. Trabajar dentro del espacio de diseño no se considera como un cambio, hacer actividades fuera del espacio de diseño, si es considerado como un cambio y se debe de iniciar un proceso de aprobación regulatorio.

El solicitante puede elegir para llevar a cabo estudios farmacéuticos de desarrollo que puedan conducir a un mejor conocimiento del rendimiento del producto a través de una gama más amplia de los atributos del material, opciones de

procesamiento y parámetros del proceso, esta inclusión de información demuestra un mayor grado de comprensión de los atributos de los materiales, procesos de fabricación y controles. Así mismo, genera oportunidades para desarrollar enfoques regulatorios más flexibles para facilitar, por ejemplo:

- Decisiones regulatorias basadas en el riesgo
- Mejora de procesos de manufactura, sin más revisión reglamentaria
- La reducción de las presentaciones posteriores a la aprobación
- Control de calidad en tiempo real, lo que lleva a una reducción de las pruebas de liberación del producto final

El diseño y la conducción de los estudios de desarrollo farmacéutico deben ser consistentes con el propósito científico. Se debe de reconocer que el nivel de conocimiento adquirido y no el volumen de datos recopilados, proporcionan la base científica para el cumplimiento y su evaluación regulatoria.

#### **2.2.4.3. ICH Q9 Manejo del riesgo de la calidad <sup>11</sup>**

Los principios de gestión de riesgos se utilizan efectivamente en muchas áreas de negocio y gobierno, incluyendo finanzas, seguros, seguridad en el trabajo, la salud pública, farmacovigilancia, y por los organismos que regulan a estas industrias.

Se entiende que el riesgo se define como la combinación de la probabilidad de que ocurra un daño y la gravedad de dicho daño. En relación a los productos farmacéuticos, aunque hay una gran variedad de partes interesadas, incluyendo los pacientes, los profesionales de la medicina, el gobierno y la industria, la protección del paciente mediante la gestión de los riesgos para la calidad debe ser considerada de primera importancia.

La fabricación y uso de un fármaco (medicamento), incluyendo sus componentes, implica un cierto grado de riesgo. El riesgo para su calidad es sólo un componente del riesgo global. Es importante entender que la calidad del producto debe ser mantenida a lo largo del ciclo de vida del producto de tal manera que los atributos que son importantes para la calidad del fármaco (medicamento) siguen siendo

consistentes con las utilizadas en los estudios clínicos. Con un enfoque de gestión de riesgo de calidad eficaz es posible garantizar aún más la alta calidad del fármaco (medicamento) controlando los posibles problemas de calidad durante su desarrollo y fabricación.

Los principios del manejo del riesgo en la calidad son:

1. La evaluación del riesgo de la calidad debe estar basada en el conocimiento científico y ligado a la protección del paciente
2. El nivel de esfuerzo, la formalidad y la documentación de los riesgos de la calidad es un proceso de gestión que debe estar acorde con el nivel de riesgo

La gestión de riesgos de calidad es un proceso sistemático para la evaluación, el control, la comunicación y la revisión de los riesgos para la calidad de los medicamentos en todo el ciclo de vida del producto.

Un modelo para la gestión de riesgos de calidad se indica en la Figura 2.2. Se podrían utilizar otros modelos. El énfasis en cada componente del marco podría diferir de un caso a otro, sin embargo, un proceso robusto incorporará la consideración de todos los elementos en un nivel de detalle que sea acorde con el riesgo específico.

En el diagrama de la Figura 2.2 no se muestran los nodos de decisión ya que estos se pueden presentar en cualquier parte del proceso. Estas decisiones podrían ser para volver al paso anterior y buscar más información para ajustar los modelos de riesgo o para dar por terminado el proceso de gestión de riesgos basado en la información que apoya tal decisión. En el diagrama de flujo "inaceptable" no sólo se refiere a los requisitos legales, legislativos o reglamentarios, sino también a la necesidad de revisar el proceso de evaluación de riesgos.

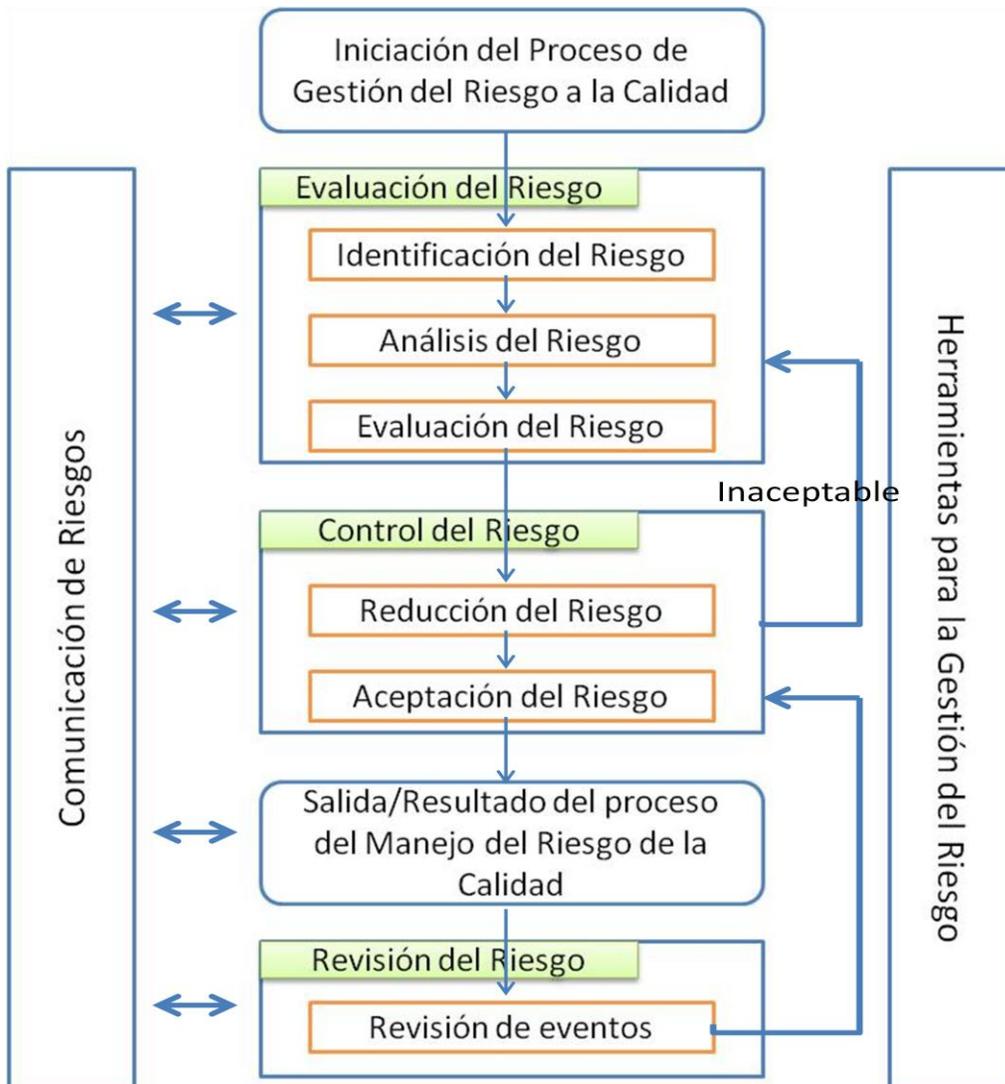


Figura 2.2 Proceso general del manejo de riesgo de la calidad (Traducido de ICH Q9)

A continuación se describen cada uno de los componentes del proceso general para el manejo del riesgo en la calidad.

- **Iniciación del proceso de manejo del riesgo de la calidad**, debe incluir procesos sistemáticos diseñados para coordinar, facilitar y mejorar la toma de decisiones.
  - Definir las preguntas sobre el problema o los riesgos, incluyendo las hipótesis que permitan identificar el potencial de riesgo

- Reunir toda la información de fondo y los datos sobre el peligro potencial, daño o impacto en la salud humana
- Identificar un líder y los recursos necesarios
- Especificar una línea de tiempo, los resultados y el nivel apropiado de decisiones para el proceso de gestión de riesgo
- **Evaluación del riesgo**, consiste en la identificación de los peligros y el análisis y evaluación de los riesgos asociados con la exposición a estos peligros. se tiene que comenzar con una descripción bien definida del problema y utilizar la herramienta adecuada, utilizando tres cuestiones fundamentales tales como:
  - ¿Qué puede salir mal?
  - ¿Cuál es la probabilidad de que algo salga mal?
  - ¿Cuáles serían las consecuencias?
- **Control del riesgo**, incluye la toma de decisiones para reducir o aceptar riesgos. el objetivo del control del riesgo es reducir el riesgo a niveles aceptables. la cantidad de esfuerzo utilizado para el control del riesgo debe ser proporcional al significado del riesgo. el control del riesgo debe enfocarse en las siguientes cuestiones:
  - **¿El riesgo está por arriba del nivel aceptable?**
  - ¿Cómo se puede hacer para reducir o eliminar el riesgo?
  - ¿Cuál es el balance apropiado entre beneficios, riesgos y recursos?
  - ¿Hay nuevos riesgos que se introducen como resultado de la identificación de los riesgos controlados?
- **Comunicación del riesgo**, es el intercambio de información sobre los riesgos y la gestión de los riesgos entre los que toman las decisiones y los demás
- Revisión del riesgo, debe ser una parte activa del proceso de gestión de la calidad. se debe de implementar un mecanismo para revisar o monitorear los eventos

#### **2.2.4.4. ICH Q3 Impurezas** <sup>12</sup>

La directriz ICH Q3 existente clasifica a las impurezas como orgánicas, inorgánicas y solventes residuales. Específicamente, las Directrices Q3A y Q3B abordan lo relativo a las impurezas orgánicas. Adicionalmente la directriz Q3C fue desarrollada para proporcionar los requisitos para solventes residuales. La nueva Directriz Q3D proporciona los requisitos para los metales, que se incluyen en la clasificación de impurezas inorgánicas.

Un enfoque armonizado para el control de impurezas metálicas, incluyendo la lista de metales específicos y los límites apropiados para estos metales, será beneficioso para ayudar a evitar la incertidumbre y la duplicación de trabajo para la industria. La EMA (Entidad Mexicana de Acreditación) proporcionó recientemente algunas directrices reguladoras sobre límites para los residuos de catalizadores metálicos y reactivos. Una directriz de la ICH se asegurará de que los nuevos requisitos tengan la información necesaria de las autoridades reguladoras regionales, en beneficio de los reguladores, la industria y la salud pública.

Una directriz ICH para las impurezas metálicas hace hincapié en el control de las cadenas de suministro y evaluación de riesgos. Este enfoque está fuera del ámbito habitual de farmacopeas y requiere una aportación significativa de las autoridades reguladoras. La nueva Directriz Q3D se centra en el establecimiento de límites adecuados para metales específicos, sin proporcionar necesariamente detalles sobre los procedimientos analíticos que se utilizarán. En apoyo de la Directriz Q3D, los procedimientos analíticos deben ser establecidos por las farmacopeas para determinar los niveles de impurezas elementales, con una previsión de uso de cualquier procedimiento validado apropiado para una aplicación en particular.

La toxicidad de las impurezas elementales está relacionada con su biodisponibilidad. Los elementos incluidos en la Guía ICH Q3D se colocaron de acuerdo a su toxicidad (PDE, Exposición Diaria Permitida) y se clasificaron en 4 categorías Ver Figura 2.3

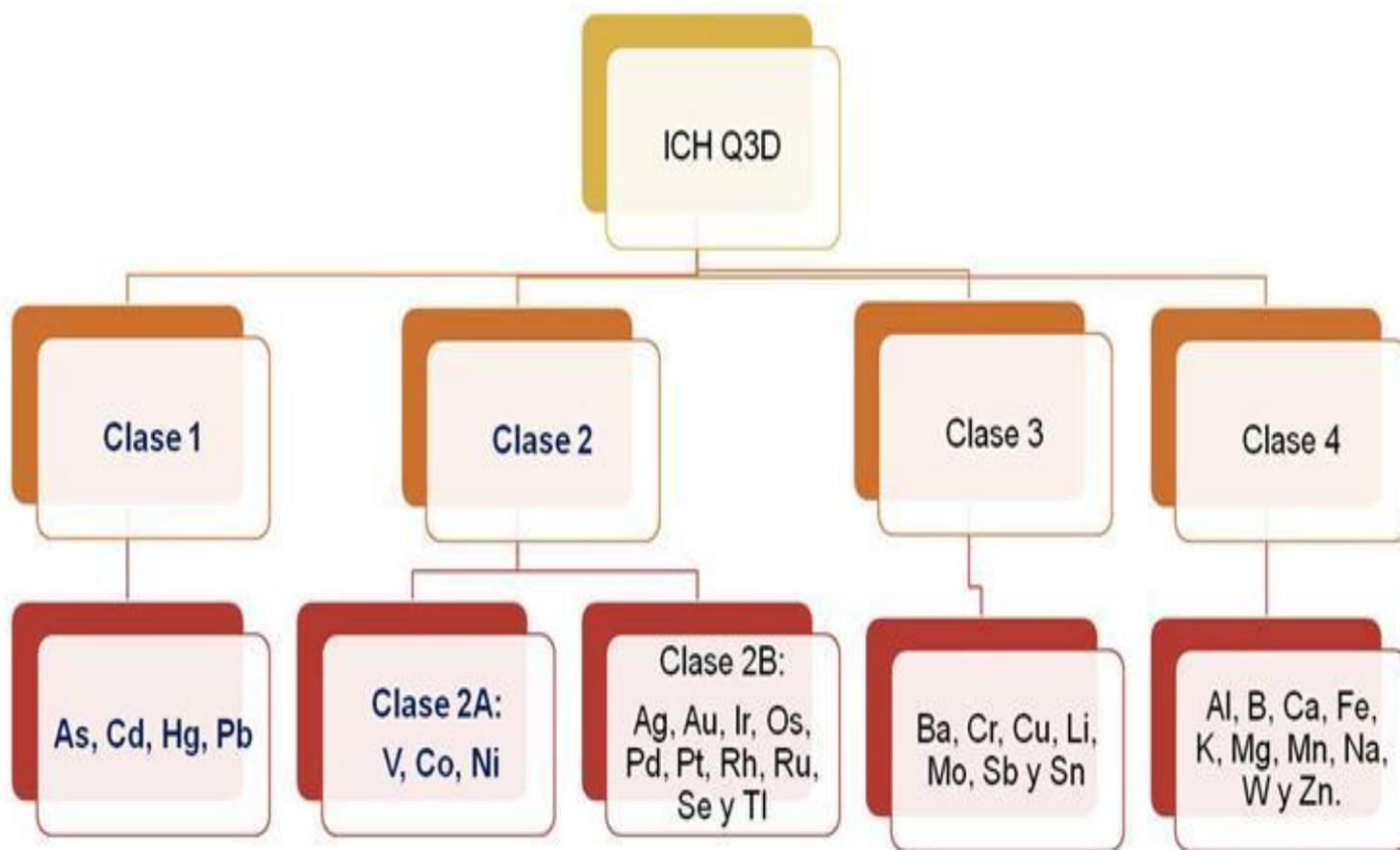


Figura 2.3 Clasificación de las impurezas elementales de acuerdo a la guía ICH Q3D (Fuente: elaboración propia)

Clase 1: As, Cd, Hg y Pb. Estos elementos son considerados como tóxicos para el humano y su uso es limitado o prohibido para la manufactura de los productos farmacéuticos. Su presencia se puede deber a los materiales usados como excipientes. Debido a su naturaleza única estos elementos deben ser considerados durante la evaluación del riesgo, en todas las rutas de administración.

Clase 2: Estos elementos son considerados como tóxicos para el humano y se subdividen en 2 grupos dependiendo de la probabilidad relativa de su presencia en los fármacos.

Clase 2A: Elementos con alta probabilidad de presencia en los fármacos y requieren ser evaluados no importando la ruta de administración. Estos elementos son: V, Co y Ni.

Clase 2B: Elementos con una baja probabilidad de presencia en los fármacos, baja abundancia. Por lo tanto, estos solo deben de ser evaluados cuando sean adicionados de manera intencional durante el proceso de fabricación, excipientes o algún componente de la ruta de síntesis. Los elementos de este grupo son: Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se y Tl.

Clase 3: Los elementos de esta clase tienen una toxicidad relativamente baja en la ruta de administración oral, pero requieren ser evaluados cuando se trate de administración por la vía parenteral o inhalada. Para la ruta de administración oral se debe considerar únicamente cuando estos sean adicionados de manera intencional. Los elementos de esta clase son: Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb y Sn.

Clase 4: Algunas impurezas elementales para los que no se han establecido las PDE debido a su baja toxicidad y / o diferencias en los reglamentos regionales. Algunos de los elementos considerados son: Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, W y Zn.

La **Tabla 2.2** muestra la exposición diaria máxima permisible en valores de ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ) para la administración de productos basados en una persona promedio de 50 kg.

Tabla 2.2. Exposición diaria máxima permisible en  $\mu\text{g}/\text{día}$

Elemento	Clase	Concentración Oral ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )	Concentración Parenteral ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )	Concentración Inhalada ( $\mu\text{g}/\text{día}$ )
Cd	1	5	2	2
Pb	1	5	5	5
As	1	15	15	2
Hg	1	30	3	1
Co	2A	50	5	3
V	2A	100	10	1
Ni	2A	200	20	5
Tl	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rh	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	100	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1200	90	20
Ba	3	1400	700	300
Mo	3	3000	1500	10
Cu	3	3000	300	30
Sn	3	6000	600	60
Cr	3	11000	1100	3

Fuente: Guía ICH Q3D, vigencia: 2014-12-16

La **Tabla 2.3** muestra la exposición diaria máxima permisible en valores de ( $\mu\text{g/g}$ ) microgramo por gramo o ppm (partes por millón) para la administración de productos basados en una persona promedio de 50 kg.

Tabla 2.3. Exposición diaria máxima permisible en ppm ( $\mu\text{g/g}$ )

Elemento	Clase	Concentración Oral ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentración Parenteral ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentración Inhalada ( $\mu\text{g/g}$ )
Cd	1	0.5	0.2	0.2
Pb	1	0.5	0.5	0.5
As	1	1.5	1.5	0.2
Hg	1	3	0.3	0.1
Co	2A	5	0.5	0.3
V	2A	10	1	0.1
Ni	2A	20	2	0.5
Tl	2B	0.8	0.8	0.8
Au	2B	10	10	0.1
Pd	2B	10	1	0.1
Ir	2B	10	1	0.1
Os	2B	10	1	0.1
Rh	2B	10	1	0.1
Ru	2B	10	1	0.1
Se	2B	15	8	13
Ag	2B	15	1	0.7
Pt	2B	10	1	0.1
Li	3	55	25	2.5
Sb	3	120	9	2
Ba	3	140	70	30
Mo	3	300	150	1
Cu	3	300	30	3
Sn	3	600	60	6
Cr	3	1100	110	0.3

Fuente: Guía ICH Q3D, vigencia 2014-12-16

### **2.3. FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y USP (Farmacopea de los Estados Unidos)** <sup>13, 19</sup>

La Convención de la Farmacopea de Estados Unidos (**USP**) es una organización independiente sin fines de lucro que establece estándares de calidad, pureza, identidad y potencia de medicamentos, ingredientes alimenticios y suplementos dietarios fabricados, distribuidos y consumidos en todo el mundo. La FDA es el organismo encargado de hacer cumplir los estándares de fármacos de USP en los Estados Unidos, y estos estándares se desarrollan y aplican en más de 140 países en todo el mundo.

En enero del 2010, la **USP** propuso límites toxicológicos para las impurezas elementales, con los cuales se pretende reemplazar los métodos existentes en el capítulo general <231> metales pesados, por técnicas modernas y de mayor sensibilidad.

Los nuevos capítulos proporcionan los límites aceptables para la presencia de impurezas elementales, capítulo <232>, basados en datos de toxicidad y niveles de exposición, así como los procedimientos para la detección de impurezas seleccionadas en los productos basados en técnicas analíticas modernas, capítulo <233>. <sup>14</sup>

El capítulo general <232> recomienda los límites para las cantidades aceptables de impurezas elementales en API's. De las 15 impurezas elementales mencionadas, 11 son catalizadores. Las cuatro restantes (As, Cd, Hg y Pb) son impurezas naturales o ambientales, de las últimas cuatro es obligatorio la evaluación de su posible presencia. <sup>15</sup>

El capítulo general <233> recomiendan las técnicas de Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-AES) y la de Espectrometría de emisión de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS) (información detallada **Anexo F**) para detectar impurezas elementales, también describe las

consideraciones para la validación y/o verificación de los procedimientos y para el reconocimiento de métodos alternos aceptables.<sup>15</sup>

La modificación de los métodos para la cuantificación de estas impurezas elementales se debe a que el método tradicional del análisis de metales de la USP<231> lleva practicándose más de cien años. El método USP<231> es un método colorimétrico, donde la muestra es comparada con un patrón de 0.001% (10 ppm) de Pb; la comparación es visual lo cual indica subjetividad en el resultado, no proporciona un ensayo límite, no es cuantitativo, no es sensible a todos los elementos tóxicos o residuos de catalizadores y se requiere de una gran cantidad de muestra (2 g) por determinación.<sup>16</sup>

En el nuevo método USP<233> la preparación de la muestra se lleva a cabo por digestión en microondas y provee una completa disolución de la mayoría de los materiales sólidos, requiere una menor cantidad de muestra (0.1 g), mejorando la eficiencia y reduciendo el tiempo de análisis.<sup>17</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

**Tecnológico**: En los últimos años, los límites de exposición a impurezas elementales tales como As, Cd, Pb y Hg han sido restringidos hasta niveles de 5 µg /día, lo cual implica que los métodos analíticos tengan que ser capaces de cuantificar concentraciones menores a 1 ppm (partes por millón). Para cumplir con lo anterior, se deben desarrollar nuevos métodos basados en técnicas analíticas modernas cuya principal ventaja sea alcanzar un límite de detección más bajo ya que las metodologías actuales cuantifican niveles de 10 ppm o mayores.

**Social**: Debe existir un control para las impurezas elementales con el fin de proporcionar un beneficio a la salud pública, estableciendo controles apropiados para estas impurezas que se conoce tienen efectos tóxicos en el ser humano. Estas impurezas pueden provenir de las materias primas, excipientes, procesos de fabricación del producto y pueden ser catalizadores, reactivos, metales pesados u otros.

**Económico**: Los requerimientos regulatorios actuales exigen el cumplimiento de especificaciones más estrictas sobre impurezas elementales. Los productos que actualmente se producen en la empresa farmoquímica, no cuentan con una metodología de análisis de impurezas elementales que se ajuste a lo establecido en las normas regulatorias internacionales ICH Q3D, por lo cual es importante el desarrollo y validación de tal metodología. Esta metodología debe poder aplicarse a todos los principios activos que ya se encuentran en el mercado internacional y están regidos por las normas ICH.

**Ambiental**: Al contar con una metodología adecuada evitaremos retrabajos y reprocesos, lo que implica costos adicionales, residuos, consumos de energía, materias primas.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una metodología general para el análisis de las posibles impurezas elementales presentes en los API's para asegurar el cumplimiento del producto de acuerdo a la ICH Q3D previo a la implementación del proceso.

### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1.1. Desarrollar una metodología analítica general para la determinación de impurezas elementales Clase 1, Clase 2A y Pd mediante la técnica de ICP-MS de acuerdo a los límites establecidos en las guías ICH Q3D en base a la dosis diaria máxima permisible
- 4.1.2. Revisar y documentar información toxicológica de cada una de las impurezas elementales a monitorear: As, Cd, Hg, Pb, V, Co, Ni y Pd
- 4.1.3. Elaborar los protocolos de validación para los métodos analíticos desarrollados, así como la validación de dichos métodos y presentación de resultados mediante un reporte de validación
- 4.1.4. Identificar y documentar el origen de las posibles fuentes de impurezas elementales en el proceso de fabricación del API a estudiar para asegurar que el producto cumpla el requerimiento regulatorio

## 5. METODOLOGÍA

La metodología que se llevó a cabo para el cumplimiento de los diferentes objetivos específicos fue la siguiente:

**Objetivo específico 1:** Desarrollar métodos analíticos para la determinación de impurezas elementales clase 1, clase 2A y Pd.

Para el desarrollo de estos métodos se utilizó la metodología indicada en el capítulo USP <233> referente a los procedimientos analíticos y considerando la dosis máxima de ingesta de 10 g/día del API, para cada elemento se determinó la concentración máxima permisible, quedando los valores como se muestra en la Tabla 5.1, estos valores corresponden con lo especificado en la guía ICH Q3D y se utilizaron los equipos, materiales, estándares y reactivos descritos más adelante <sup>18</sup>

Tabla 5.1 Especificación vigente para las impurezas elementales

Elemento	As	Cd	Hg	Pb	V	Co	Ni	Pd
Clase	1	1	1	1	2A	2A	2A	2B
Especificación Vigente (ppm)	1.5	0.5	3	0.5	10	5	20	10

Fuente: Guía ICH Q3D, vigencia 2014-12-16

### Equipos y materiales

- ICP-MS 7700 Series Agilent Technologies
- Digestor Mars Express
- Balanza Analítica Sartorius
- Agilent MassHunter Workstation Software for 7700 Series ICP-MS
- Tubos de teflón para digestión de muestras

- Micropipetas de 5 mL, 1000 µL, 100 µL
- Matraces volumétricos de 100, 50, 25 y 10 mL
- Acrodiscos de nylon de 0.2 µm
- Jeringas de 5 mL

Estándares y reactivos:

- Soluciones estándar de Indio, Arsénico, Cadmio, Mercurio, Plomo, Vanadio, Cobalto, Níquel y Paladio [1000 mg/L]
- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 70%, Aldrich, nivel trazas
- Ácido clorhídrico (HCl), 36.5 – 38.0%, J.T. Baker, nivel trazas
- Agua desionizada

**Objetivo específico 2:** revisar y documentar información toxicológica de las principales impurezas elementales a monitorear

Se llevó a cabo la revisión bibliográfica de las principales impurezas elementales a monitorear (Arsénico, Cadmio, Mercurio, Plomo, Vanadio, Cobalto, Níquel y Paladio) utilizando principalmente lo descrito en la guía ICH Q3D vigente a partir del 16- diciembre-2014 y en diferentes bibliografías como la ATSDR que nos ayudará a comprender la importancia de su evaluación en los principios activos farmacéuticos y que son para el consumo humano.

**Objetivo específico 3:** Elaborar los protocolos de validación para los métodos analíticos desarrollados, validación y reporte de resultados <sup>10, 18</sup>

Con base en los requerimientos de la empresa farmoquímica y de la USP <233> se elaboraron los protocolos de validación que incluyeron las diferentes pruebas a evaluar y los criterios de aceptación tal como se muestran en las Tablas 5.2 y 5.3 para la determinación de impurezas elementales clase 1, clase 2A y Paladio

Tabla 5.2 Criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos utilizados en la empresa farmoquímica. (Fuente: Protocolos de validación)

Parámetro	Criterio de aceptación
Estabilidad de la solución estándar stock	90 al 100 % de la concentración teórica
Estabilidad de la solución estándar de trabajo	90 al 110 % de la concentración teórica
Estabilidad de la solución muestra	La respuesta del analito no aumenta ni disminuye por arriba del límite de cuantificación
Linealidad ( $r^2$ )	$\geq 0.99$
Límite de Cuantificación %DER <sup>a</sup> de la respuesta	No más de 10%
Límite de Detección	Se observa respuesta
Exactitud (% recobro al límite de cuantificación, 100 y 120 %)	70 – 150 % de la cantidad adicionada
Precisión (% de diferencia de los promedios)	No más de 15%
Rango	LC – 120% de la concentración objetivo
Robustez	Conforme

<sup>a</sup>Desviación Estándar Relativa

Tabla 5.3 Criterios para la validación de métodos conforme a la USP <232> para procedimientos cuantitativos. (Fuente: USP vigente)

Parámetro	Criterio de aceptación
Exactitud	Recobro del 70 al 150 % para la media de tres preparaciones repetidas a cada concentración
Repetibilidad	Seis muestras independientes, DER No más de 20 %
Tolerancia (precisión intermedia)	Días distintos, equipos distintos o analistas diferentes, DER No más de 25%.
LC, intervalo y linealidad	Se demuestra cumpliendo los parámetros de exactitud

**Objetivo específico 4:** Identificar y documentar el origen de las posibles fuentes de impurezas elementales en el proceso de fabricación del API a estudiar para asegurar que el producto cumpla el requerimiento regulatorio

Se utilizó uno de los productos desarrollados en la empresa farmoquímica para desarrollar y validar los métodos analíticos desarrollados para la determinación de impurezas elementales clase 1, clase 2A y paladio. Resultados iniciales Tabla 5.4. Se llevó a cabo el monitoreo de una de las impurezas que se encontraban presentes en el producto (paladio), y se le dio seguimiento desde las materias primas hasta el producto final. El proceso del producto estudiado se muestra en la Figura 5.1

Tabla 5.4 Resultados iniciales obtenidos del monitoreo de las diferentes impurezas elementales

Elemento	Especificación conforme a la guía ICH Q3D (ppm)	Resultado Inicial
As	1.5	ND
Cd	0.5	ND
Hg	3	ND
Pb	0.5	ND
V	10	ND
Co	5	ND
Ni	20	ND
Pd	35	100

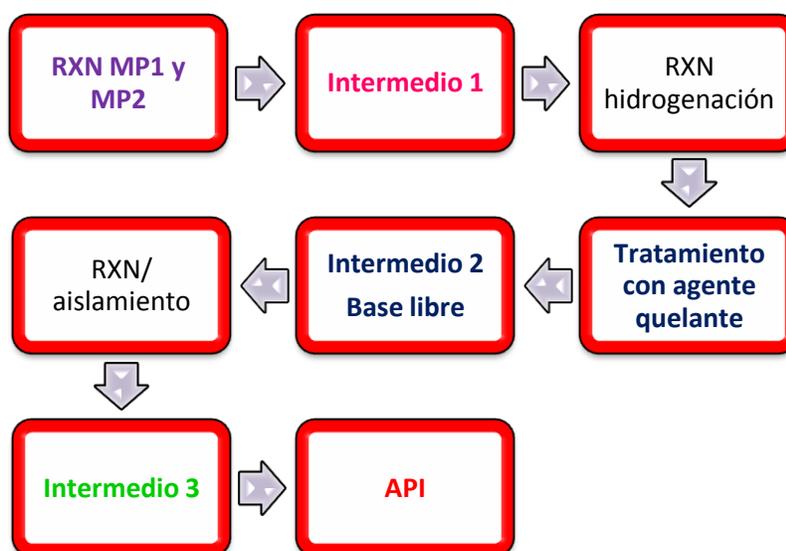


Figura 5.1. Proceso general del API estudiado

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Desarrollo de métodos analíticos

Se desarrollaron métodos analíticos generales en el Laboratorio de I&D Analítico mediante la técnica de ICP-MS para la cuantificación de Impurezas Elementales Clase 1 (As, Cd, Pb y Hg), impurezas elementales clase 2A (V, Co y Ni) y Clase 2B (Pd) para los productos desarrollados y producidos en la empresa farmoquímica.

Para el desarrollo de estos métodos analíticos se consideró la metodología indicada en el capítulo USP <233> referente a los procedimientos y se consideró la dosis máxima de ingesta de 10 g/día del API, así para cada elemento se determinó la concentración máxima permisible, quedando los valores como se muestra en la Tabla 6.1, estos valores corresponden con lo especificado en el capítulo <232> de la USP 38 NF 33 segundo suplemento que entro en vigor el 1 de diciembre del 2015 donde se homologaron con los valores recomendados en la guía ICH Q3D versión 16 diciembre 2014.

Tabla 6.1 Especificación de las impurezas elementales para el API estudiado

Elemento	As	Cd	Hg	Pb	V	Co	Ni	Pd
Clase	1	1	1	1	2A	2A	2A	2B
Especificación Vigente (ppm)	1.5	0.5	3	0.5	10	5	20	10 <sup>a</sup>

. Fuente: Guía ICH Q3D, vigencia 2014-12-16

<sup>a</sup> La especificación para paladio puede modificarse dependiendo de la exposición diaria permitida del producto, en particular para el caso de estudio el Pd se validó con una especificación de 20 ppm

Para cada uno de los elementos se preparó una curva de calibración que va desde el 12.5 % de la especificación hasta el 200 %, estos métodos fueron posteriormente validados para asegurar que los resultados obtenidos fueran confiables.

El método desarrollado para la determinación de As, Cd, Hg y Pb fue probado y aplicado satisfactoriamente a más de 60 productos producidos dentro de la empresa. El método general para la determinación de V, Co y Ni, fue aplicado a 69 productos, en el caso del método para la determinación de Pd se utilizó en los productos en los que durante su proceso de manufactura fue utilizado este elemento como catalizador.

El método general para la determinación de impurezas elementales clase 1 no se aplicó a la misma cantidad de productos que el método general para la determinación de impurezas elementales clase 2A debido a la naturaleza de la molécula, por lo cual se tuvieron que desarrollar métodos adicionales para poder realizar la cuantificación.

## 6.2 Toxicidad de las impurezas elementales <sup>12</sup>

Se revisó y documentó la información toxicológica de cada una de las principales impurezas elementales a monitorear As, Cd, Hg, Pb, V, Co, Ni y Pd, la información se encuentra resumida en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Información toxicológica de las impurezas elementales analizadas

Elemento	PDE- Oral (µg/g)	Clase	Fuente	Consecuencias
Arsénico	1.5	1	Compuestos inorgánicos	Genotóxico, carcinógeno, piel, hígado, pulmón, riñón y la vejiga
Cadmio	0.5	1	Sales de cadmio solubles en agua	Genotóxico, carcinógeno, pulmón, riñón y próstata
Mercurio	3	1	Mercurio elemental e inorgánico	Efectos toxicológicos, neuronales, hematopoyéticos, corrosivo, efectos renales y enfermedades cutáneas
Plomo	0.5	1	Compuestos orgánicos e inorgánicos	Efectos neurológicos, reproductivos, de desarrollo, inmunológico, cardiovasculares y renales
Vanadio	10	2A	Pentóxido de vanadio	Genotóxico, posible carcinogénico
Cobalto	5	2A	cloruro de cobalto	Policitemia, por exposición repetida
Níquel	20	2A	Sales de níquel	Genotóxico, dolor de estómago, depresión del peso corporal y los efectos adversos en la sangre y los riñones
Paladio	10	2B	Catalizadores Pd <sup>2+</sup>	Se acumula en el riñón y se elimina a través de la vía fecal

Fuente: Elaboración propia con información de la guía ICH Q3D

En la Tabla 6.2 solo se consideraron los elementos que deben ser monitoreados de manera obligatoria debido a su toxicidad a concentraciones muy bajas. El valor de PDE (Exposición Diaria Permitida) oral se encuentra homologado tanto en las guías ICH como en la USP

Para información más detallada se puede consultar el **Anexo E** de información toxicológica

### **6.3 Resultados de la validación de los métodos analíticos**

Se elaboraron los protocolos de validación para los métodos analíticos generales para la determinación de impurezas elementales clase 1, clase 2A y Pd por ICP-MS, los cuales cuentan con un código interno asignado.

Estos documentos cuentan el objetivo y diseño de la validación en la cual se describe el método analítico, los estándares a utilizar, la muestra, tipo de validación a realizar, descripción de los parámetros a evaluar y la descripción de cómo realizar las pruebas tales como, idoneidad del sistema, robustez, estabilidad de las soluciones (estándar y muestra), linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, exactitud, precisión y rango. Incluyen también los criterios de aceptación. Previamente descritos en el apartado de validación 2.2.4.1. ICH Q2 Validación Analítica

Se hizo la validación de los métodos analíticos conforme a lo establecido en los protocolos de validación, se ejecutaron las pruebas tal como se describen utilizando una muestra representativa de planta productiva, que se encuentra aprobada y cuenta con su certificado analítico. Se llevaron a cabo pruebas de idoneidad del sistema, estabilidad de las soluciones, linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, exactitud, precisión, rango y robustez. Los resultados se encuentran agrupados por grupo de impurezas y se resumen en las Tablas 6.3, 6.4 y 6.5

Los resultados fueron descritos en un reporte de validación asignado con un código interno. El detalle de los resultados obtenidos se puede encontrar en los **Anexos B, C y D** de este documento

Los resultados demuestran que los productos cumplen con el atributo de calidad establecido para el contenido de impurezas elementales a los niveles establecidos

por las guías ICH para las diferentes impurezas monitoreadas como se puede observar en las Tablas 6.3, 6.4 y 6.5.

Tabla 6.3. Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de Impurezas Elementales clase 1

Parámetro	As	Cd	Hg	Pb
Estabilidad de la solución estándar de trabajo (%Recobro 93 horas/ temperatura ambiente)	100	99	96	97
Estabilidad de la solución muestra (%Recobro 22 horas/ temperatura ambiente)	La respuesta de As, Cd, Hg y Pb no incrementa ni disminuye por arriba del límite de cuantificación			
Linealidad ( $r^2$ )	1.00	1.00	1.00	1.00
Límite de Cuantificación Concentración en $\mu\text{g/L}$ ppm de la concentración de la muestra %DER de la respuesta <sup>1</sup>	1.5 0.375 2	0.5 0.125 3	3.0 0.750 0	1.0 0.250 1
Límite de Detección Concentración en $\mu\text{g/L}$ ppm de la concentración de la muestra	0.75 0.1875	0.25 0.0625	1.50 0.3750	0.25 0.0625
Exactitud (%recobro) Al límite de cuantificación 100% de la especificación 120% de la especificación	114 121 120	99 97 93	95 97 89	86 86 84
Precisión (% de diferencia de los promedios)	3	2	7	6
Rango	LC – 120% de la concentración objetivo			
Robustez	Conforme			

Fuente: Elaboración propia

<sup>1</sup> Relación  $\text{CPS}_{\text{Analito}}/\text{CPS}_{\text{In}}$

Donde:  $\text{CPS}_{\text{analito}}$ : Cuentas por segundo del Analito (As, Cd, Hg, Pb)

$\text{CPS}_{\text{In}}$ : Cuentas por segundo del estándar interno

Tabla 6.4. Resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de Impurezas Elementales clase 2A

Parámetro	V	Co	Ni
Estabilidad de la solución estándar stock (%Recobro 151 horas/ refrigeración)	98	102	101
Estabilidad de la solución estándar de trabajo (%Recobro 17 horas/ temperatura ambiente)	110	106	105
Estabilidad de la solución muestra (%Recobro 22 horas/ temperatura ambiente)	La respuesta de V, Co y Ni no incrementa ni disminuye por arriba del límite de cuantificación		
Linealidad ( $r^2$ )	1.00	1.00	1.00
Límite de Cuantificación (LC) Concentración en $\mu\text{g/L}$ ppm de la concentración de la muestra %DER de la respuesta <sup>1</sup>	2.500 2.50 3	1.250 1.25 1	5.000 5.00 1
Límite de Detección Concentración en $\mu\text{g/L}$ ppm de la concentración de la muestra	1.2500 1.250	06250 0.625	2.5000 2.500
Exactitud (% recobro) Al límite de cuantificación Al 100% de la especificación Al 120% de la especificación	102 91 103	104 91 101	114 90 101
Precisión (% de diferencia de los promedios)	12	11	10
Rango	LC – 120% de la concentración objetivo		
Robustez	Conforme		

Fuente: Elaboración propia

<sup>1</sup> Relación  $\text{CPS}_{\text{Analito}}/\text{CPS}_{\text{In}}$

Donde:  $\text{CPS}_{\text{analito}}$ : Cuentas por segundo del Analito (V, Co y Ni)

$\text{CPS}_{\text{In}}$ : Cuentas por segundo del estándar interno

Tabla 6.5. Resultados obtenidos de la validación del método para la determinación de Paladio

Parámetro	Pd
Estabilidad de la solución estándar stock (%Recobro 93 horas/ refrigeración)	101
Estabilidad de la solución estándar de trabajo (%Recobro 92 horas/ temperatura ambiente)	98
Estabilidad de la solución muestra (%Recobro 92 horas/ temperatura ambiente)	La respuesta de Pd no incrementa ni disminuye por arriba del límite de cuantificación
Linealidad ( $r^2$ )	1.00
Límite de Cuantificación Concentración en $\mu\text{g/L}$ ppm de la concentración de la muestra %DER de la respuesta CPS Pd	12.5 2.5 3
Límite de Detección Concentración in $\mu\text{g/L}$ ppm de la concentración de la muestra	6.25 1.25
Exactitud (% recobro) Al límite de cuantificación Al 100% de la especificación Al 120% de la especificación	79 96 96
Precisión (% de diferencia de los promedios)	3
Rango	LC – 120% de la concentración objetivo
Robustez	Conforme

Fuente: Elaboración propia

CPS Pd: Cuentas por segundo de Pd

Los resultados de estas validaciones indican que los métodos analíticos son adecuados para el propósito que fueron diseñados ya que son capaces de cuantificar las IE de interés a los niveles más estrictos que solicitan las diferentes agencias reguladoras por ser precisos, exactos y robustos; y se consideran vigentes mientras no haya modificaciones en el proceso de manufactura del API que pudiera afectar a la preparación de la muestra, o algún cambio en los requerimientos regulatorios

#### 6.4 Resultados de la identificación de las posibles fuentes de impurezas elementales en el proceso de fabricación de un API para asegurar que el producto cumpla con el requerimiento regulatorio

Al inicio del desarrollo del API a estudiar, se probó la tecnología estándar reportada, sin embargo el contenido de paladio no se eliminaba de manera eficiente en ninguna de las etapas del proceso, obteniendo siempre niveles mayores a 100 ppm. En los análisis se encontró que la materia prima era la que contenía niveles de Pd >500 ppm. Por lo que se realizaron pruebas para remover el paladio en las diferentes etapas. Ver Figura 6.1 del proceso del API

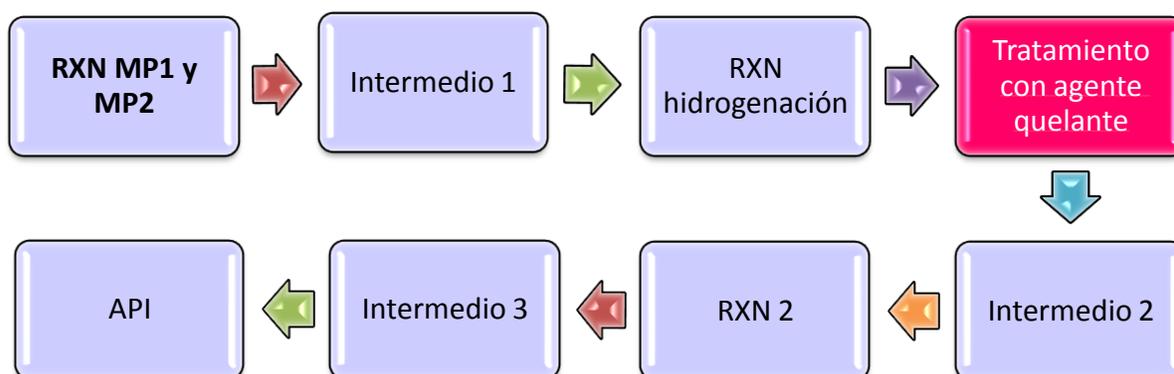


Figura 6.1 Proceso del API de estudio

En la materia prima (MP) se realizaron tratamientos con carbón activado a diferentes concentraciones obteniendo resultados desde 26 – 82 ppm y con rendimientos del 73 al 85 % en peso. Ver Tabla 6.6

En el intermedio 1, se realizó un tratamiento de carbón activado en donde la reducción del paladio fue de 500 ppm a 100 ppm. Ver Tabla 6.6

En la etapa de la hidrogenación se realizaron 2 experimentos, uno de carbón activado donde se redujo de 500 ppm hasta 50 ppm y posteriormente se incorporó un tratamiento con agente quelante en donde se redujo la concentración de Pd a niveles menores a 20 ppm. Ver Tabla 6.6

Tabla 6.6. Evaluación del contenido de paladio en las diferentes etapas del proceso del API

Evaluación de contenido de Paladio en las diferentes etapas		ppm	Rendimiento
MP 1	Tratamiento con carbón activado	26 hasta 82	72 al 92 %
Imina	Tratamiento con carbón activado	100	
Base libre	Tratamiento agente quelante (triplicado)	40 hasta 60	
monotosilado		21 hasta 37	
Ditosilado		17	

Posteriormente se realizó la optimización del proceso de eliminación del paladio utilizando el agente quelante mediante cinéticas de eliminación, en las cuales se tomaron muestras a diferentes tiempos y se fue evaluando el contenido de paladio. Ver Tabla 6.7

Tabla 6.7. Resultados del contenido de Pd (ppm) en las pruebas preliminares de tiempo extendido utilizando el agente quelante

Número de experimento	Primer tratamiento con agente quelante (Crudo de reacción)				Aislado	
	2 h	4 h	12 h	18 h	Intermedio 3	API
1	190.6	127.6	73.1			
2		79.3			25.6	
3			39.8		9.7	
4				20.5	5.46	4.52

Con base a los resultados obtenidos se realizó un espacio de diseño tomando en cuenta la cantidad de agente quelante, la temperatura y tiempo del tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 6.8

Tabla 6.8 Eficiencia de eliminación del paladio

Experimento	Tiempo (horas)	Smopex (%p/p)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	Contenido de Pd	
					Intermedio 2	Intermedio 3
1	2	5	20	86.66	226.40	131.13
2	30	5	20	84.30	113.18	47.91
3	2	20	20	85.62	204.93	101.83
4	30	20	20	80.30	32.78	16.65
5	2	5	35	85.93	191.40	106.20
6	30	5	35	80.70	50.81	26.71
7	2	20	35	84.05	135.79	54.47
8	30	20	35	82.03	26.16	7.36
9	16	12.5	27.5	83.79	50.06	23.73
10	16	12.5	27.5	81.53	48.34	22.32
11	16	12.5	27.5	85.71	47.64	22.87

Las condiciones para el tratamiento de acuerdo a estos resultados serían: 16 horas, 12.5 % p/p agente quelante, a 27.5 °C, para obtener un contenido menor a 25 ppm de Pd en el intermedio 3 con rendimiento adecuado. Posteriormente se monitoreo el producto final en donde se llegan a obtener resultados de hasta 17 ppm.

En el caso de este producto en particular se fijo una especificación mayor a la más estricta debido a la dosis máxima que se ingiere del producto, fijándose en 20 ppm valor al cual se valido el método analítico para la determinación de contenido de paladio en muestras del API

## 7. CONCLUSIONES

El desarrollo de los métodos analíticos para la determinación de impurezas elementales mediante la técnica de ICP-MS se llevo a cabo satisfactoriamente para todas las impurezas objetivo de este trabajo y los principios activos estudiados, utilizando las especificaciones vigentes de la guía *ICH Q3D step 4* (2016-04-16)

La revisión de información toxicológica sobre las principales impurezas elementales nos ayudó a comprender la importancia de su evaluación en los principios activos farmacéuticos y a establecer los niveles a los cuales se debían desarrollar las metodologías analíticas para asegurar que el contenido de las impurezas en los APIs fuera aceptable para el consumo humano.

Los resultados de la validación de los métodos analíticos indican que los métodos desarrollados para la cuantificación de impurezas elementales clase 1 (As, Cd, Hg y Pb), clase 2A (V, Co y Ni) y Clase 2B (Pd), son adecuados para el propósito que fueron diseñados ya que son capaces de cuantificar estos elementos a los niveles más estrictos que solicitan las diferentes agencias reguladoras, además de ser precisos, exactos y robustos.

Los resultados demuestran que los productos cumplen con el atributo crítico de calidad establecido por las guías ICH y la USP para las diferentes impurezas elementales monitoreadas.

La aplicación del control del contenido de impurezas elementales durante el desarrollo de un producto en la empresa farmoquímica nos permitió poner en práctica el concepto de calidad por diseño, ya que a través de la cuantificación de las impurezas elementales en las diferentes etapas del proceso se pudieron determinar las etapas críticas y se realizaron espacios de diseño para un mejor control de la calidad del API desde las materias primas hasta el producto final.

## 8. REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Diccionario de la real academia española
- <sup>2</sup> ICH Q8, step 4, August 2009, “Pharmaceutical development”
- <sup>3</sup> NOM-059-SSA1-2013, DOF 22Julio 2013, Norma Oficial Mexicana, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos
- <sup>4</sup> Medicamentos esenciales y productos de salud, seguimiento y garantía de la calidad de los medicamentos. Revisado Diciembre 2015. Recuperado de:  
<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js8121s/7.3.html>
- <sup>5</sup> Cousiño, Jose Manuel, Marzo 2008, Calidad de los medicamentos e importancia para su prescripción
- <sup>6</sup> Tobalina, Fernando. Enero 2013, Nueva norma USP-232 y 233. Análisis de impurezas metálicas en productos farmacéuticos. Recuperado de:  
<http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/E%20seminar%20USP%202013.pdf>
- <sup>7</sup> Velez, Elington, Mayo 2014. Control de medicamentos
- <sup>8</sup> ICH Página Oficial, revisado Diciembre 2015. Recuperado de:  
<http://www.ich.org/home.html>
- <sup>9</sup> ICH, Página oficial, revisado Noviembre 2015. Recuperado de:  
<http://www.ich.org/products/guidelines.html>
- <sup>10</sup> ICH Q2 (R1), step 4, November 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology
- <sup>11</sup> ICH Q9, step 4, 9 November 2005, Quality Risk Management, Dated and endorsed on 11 November 2003
- <sup>12</sup> ICH Q3D, step 4, 16 December 2014, Guideline for elemental impurities, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
- <sup>13</sup> USP U.S. Pharmacopeial Convention, Revisado en Octubre 2015, Recuperado de:  
<http://www.usp.org/es/usp>

- <sup>14</sup> Agilent technologies, A replacement for USP<231> Heavy metals, improve accuracy and productivity using ICP-MS for the measurement of heavy metals in pharmaceutical materials
- <sup>15</sup> News medical, 24 Mayo 2012, USP anuncia dos nuevos patrones relacionados con las impurezas elementales. Recuperado de:  
<http://www.news-medical.net/news/20120524/12138/Spanish.aspx>
- <sup>16</sup> Columbia Analytical Services, USP<231> Comparison to instrumental methods <232> and <233>
- <sup>17</sup> PerkinElmer, Inc. Implementation of USP New Chapters <232> and <233> on elemental impurities in pharmaceutical Products. Recuperado de:  
[http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/WHT\\_Implementation-of-USP-232-233.pdf](http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/WHT_Implementation-of-USP-232-233.pdf)
- <sup>18</sup> USP (2012), Capítulo general <233> Impurezas elementales – procedimientos / pruebas químicas, segundo suplemento. Recuperado de:  
[http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/key-issues/233---2s\\_usp\\_35---final.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/233---2s_usp_35---final.pdf)
- <sup>18</sup> USP, Boletín de revisión, Capítulo general <232> Impurezas elementales – límites. Recuperado de:  
[http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/key-issues/c232\\_final.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/c232_final.pdf)
- <sup>18</sup> ICH, Noviembre 2005, Validación de procedimientos analíticos, texto y metodología Q2 (R1). Recuperado de  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
- <sup>19</sup> Fernandez, Joaquin. 14 Febrero 2011, ¿Qué es la FDA?. Recuperado de:  
<http://www.qvision.es/blogs/joaquin-fernandez/2011/02/%C2%BFque-es-la-fda/>
- <sup>20</sup> Michelle Cree, Kimberly Davis and Sam Jones, evaluation of digestion approaches for determination of elemental impurities in support of USP<232> and <233>

- <sup>21</sup> Ruth E. Wolf, Ph.D., Research Chemist, USGS/Central Region/Crustal Imaging & Characterization Team, March 2005]. Recuperado de: <http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html>
- <sup>22</sup> Perkin Elmer, Technical note ICP-Mass Spectrometry, The 30-minute guide to ICP-MS. Recuperado de [http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch\\_icpmsthirtyminuteguide.pdf](http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf)
- <sup>23</sup> European Pharmacopoeia 8.0, 2. Methods of analysis, chapter 2.2.58. Inductively coupled plasma – mass spectrometry.
- FDA, Food and Drug Administration, recuperado de: <http://www.fda.gov/downloads/Regulatoryinformation/Guidances/ucm127984.pdf>
- USP(2012), capítulo general <231> Metales pesados
- USP(2012), capítulo general <232> Impurezas elementales - límites
- NOM-001-SSA1-2010, DOF 26 Enero 2011, Que instituye el procedimiento por el cual se revisará, actualizará y editará la farmacopea de los estados unidos mexicanos
- NOM-164-SSA1-2013, DOF 25 Junio 2013, Buenas prácticas de fabricación de los fármacos
- NOM-052-SEMARNAT-2005, DOF 23 Junio 2006 Norma Oficial Mexicana que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- NMX-EC-17025-IMNC-2006, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y ensayo.
- ICH Q1, step 4, 6 Febrero 2003, Stability testing of new drug substances and products

- ICH Q3D, step 2, 26 July 2013, Guideline for elemental impurities, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
- ICH Q6A, step 4, 16 October 1999, Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances
- ICH Q7, step 4, 10 November 2000, “Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients”
- ICH Q10, step 4, 4 June 2008, Pharmaceutical Quality System (PQS)
- ICH Q11, step 4, 01 May 2012, Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities)
- USP-NF, United State Pharmacopeia, National Formulary, recuperado de: <http://www.usp.org/es/usp>

## ANEXO A.- MARCO JURÍDICO

El presente trabajo se basa en los lineamientos establecidos por los diferentes organismos nacionales e internacionales. La Conferencia Internacional sobre Armonización ICH, es el único organismo capaz de reunir a las autoridades reguladoras y a la industria farmacéutica de Europa, Japón y los EE.UU. para discutir aspectos científicos y técnicos de registro de medicamentos (Tratados internacionales). En la Figura A.1 se muestra la pirámide legislativa dentro de la cual se encuentra comprendido el presente trabajo. Así mismo, en la Tabla A.1 se muestran las diferentes leyes, normas y reglamentos aplicables al proyecto.



Figura A.1. Pirámide legislativa

**Tabla A.1 Marco Jurídico del proyecto**

<p>Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos</p>	<p>Establece la existencia de órganos de autoridad, sus facultades y limitaciones, así como los derechos de los individuos y las vías para hacerlos efectivos. La teoría jurídica mexicana divide el estudio de la Constitución en dos grandes partes: la dogmática, que incluye las garantías o derechos individuales; y, la pragmática, que establece: 1) la estructura, funcionamiento, y facultades de los poderes federales y locales; 2) los principios que rigen a la nación y estados mexicanos; 3) prevenciones generales y complementarias; y, 4) disposiciones transitorias.</p>
<p>Ley Federal sobre Metrología y Normalización</p>	<p>El principal objetivo de la LFMN es alentar a las empresas a adoptar mayores normas de calidad, lo que, a su vez, elevará su grado de competitividad.</p> <p>Los objetivos de esta Ley se establecen en el artículo segundo de la misma y entre otros son:</p> <p>I. En materia de Metrología: a) establecer el Sistema General de Unidades de Medida; b) precisar los conceptos fundamentales sobre metrología; c) establecer los requisitos para la fabricación, importación, reparación, venta verificación y uso de los instrumentos para medir y los patrones de medida; d) establecer la obligatoriedad de la medición en transacciones comerciales y de indicar el contenido neto en los productos envasados; e) instituir el Sistema Nacional de Calibración; f) crear el Centro Nacional de Metrología, como organismo de alto nivel técnico en la materia; y, g)</p>

	<p>regular, en lo general, las demás materias relativas a la metrología</p> <p>II. En materia de normalización, certificación, acreditamiento y verificación: a) fomentar la transparencia y eficiencia en la elaboración y observancia de normas oficiales mexicanas y normas mexicanas; b) instituir la Comisión Nacional de Normalización para que coadyuve en las actividades que sobre normalización corresponde realizar a las distintas dependencias de la administración pública federal; c) establecer un procedimiento uniforme para la elaboración de normas oficiales mexicanas por las dependencias de la administración pública federal; d) promover la concurrencia de los sectores público, privado, científico y de consumidores en la elaboración y observancia de normas oficiales mexicanas y normas mexicanas; e) coordinar las actividades de normalización, certificación, verificación y laboratorios de prueba de las dependencias de administración pública federal; f) establecer el sistema nacional de acreditamiento de organismos de normalización y de certificación, unidades de verificación y de laboratorios de prueba y de calibración; y, g) en general, divulgar las acciones de normalización y demás actividades relacionadas con la materia.</p>
Ley General de Salud	<p>Establece la forma de organización y las competencias o atribuciones de los servicios de salud, pero fundamentalmente, especifica la forma en que debemos ser tratadas todas las personas, para solucionar cualquier problema de salud, independientemente de</p>

	nuestra edad, sexo, condición física y social, religión, tendencia política o afiliación a alguna institución en particular
NOM-001-SSA1-2010	<p>Que instituye el procedimiento por el cual se revisará, actualizará y editará la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos</p> <p>Esta norma es de observancia obligatoria para la Secretaría de Salud a través de la Dirección Ejecutiva de Farmacopea y Farmacovigilancia de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y para la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, así como para el sector público y privado que participe en el procedimiento de revisión, actualización</p>
NOM-052-SEMARNAT-2005	<p>Norma Oficial Mexicana que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.</p> <p>Esta Norma Oficial Mexicana establece el procedimiento para identificar si un residuo es peligroso, el cual incluye los listados de los residuos peligrosos y las características que hacen que se consideren como tales. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en lo conducente para los responsables de identificar la peligrosidad de un residuo</p>
NOM-059-SSA1-2013	<p>Norma Oficial Mexicana, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos</p> <p>Esta Norma establece los requisitos mínimos necesarios</p>

	<p>para el proceso de fabricación de los medicamentos para uso humano comercializados en el país y/o con fines de investigación. Esta Norma es de observancia obligatoria, para todos los establecimientos dedicados a la fabricación y/o importación de medicamentos para uso humano comercializados en el país y/o con fines de investigación, así como los laboratorios de control de calidad, almacenes de acondicionamiento, depósito y distribución de medicamentos y materias primas para la elaboración</p>
<p>NOM-164-SSA1-2013</p>	<p>Buenas prácticas de fabricación de los fármacos</p> <p>Esta Norma establece los requisitos mínimos necesarios para el proceso de fabricación de los fármacos o principios activos comercializados en el país o para fármacos en desarrollo para uso en investigación clínica. Esta Norma es de observancia obligatoria, para todos los establecimientos dedicados a la fabricación de fármacos o principios activos comercializados en el país o fármacos en desarrollo para uso en investigación clínica y almacenes de distribución de fármacos o principios activos.</p>
<p>NMX-EC-17025- IMNC-2006</p>	<p>Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y ensayo.</p> <p>Los Requerimientos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo se publicaron por ISO en diciembre de 1999 y se revisó en mayo de 2005. Es el resultado de la asociación entre La Organización Internacional de Normas y La Comisión Electrotécnica</p>

	<p>Internacional. La norma reemplaza la Guía ISO 25 y EN 45001 y toma en consideración la experiencia de operaciones que se obtuvo desde que se publicaron las normas anteriores.</p>
ISO/IE 17025:2005	<p>“General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”</p> <p>Esta Norma Internacional establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o de calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio.</p>
ICH Q1	<p>Stability testing of new drug substances and products</p> <p>Recomendaciones sobre los protocolos de pruebas de estabilidad incluyendo la temperatura, la humedad y la duración del ensayo para la zona climática I y II</p>
ICH Q2 (R1)	<p>Validation of analytical procedures: text and methodology</p> <p>Identificación de los parámetros de validación necesarios para una variedad de métodos analíticos, también se analizan las características que deben de considerar durante la validación de los procedimientos analíticos que se incluyen como parte de las solicitudes de registro</p>
ICH Q3D	<p>Guideline for elemental impurities, International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use</p> <p>La Directriz ICH Q3A existente clasifica impurezas como</p>

	<p>orgánicas, inorgánicas y solventes residuales. Las Directrices Q3A y Q3B abordan con eficacia los requisitos de impurezas orgánicas. Una directriz Q3C adicional fue desarrollada para proporcionar aclaraciones sobre los requisitos para disolventes residuales. La propuesta de nueva Directriz Q3D proporcionaría una aclaración similar de los requisitos para los metales, que se incluyen en la clasificación de las impurezas inorgánicas de la ICH</p>
<p>ICH Q6 Specifications</p>	<p>Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances</p> <p>Esto aborda el proceso de selección de las pruebas y los métodos y establecer las especificaciones para los ensayos de sustancias y formas farmacéuticas. Ha tenido en cuenta la considerable guía e información que están presentes en los documentos regionales existentes</p>
<p>ICH Q7A</p>	<p>“Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients”</p> <p>La supervisión de medicamentos se basa en dos aspectos principales: la calidad del diseño y la calidad de la conformidad. La calidad del diseño es evaluada por las autoridades competentes a través del expediente de solicitud de autorización de comercialización. Además de la eficacia y la seguridad, se consideran aspectos de calidad "farmacéuticos" (incluido el método de fabricación, pruebas, etc). La Calidad de la conformidad se basa principalmente en la calidad de la producción,</p>

	que debe estar en conformidad con la autorización de comercialización, para garantizar la coherencia de la producción y operación de un sistema de aseguramiento de la calidad.
ICH Q9	<p>Quality Risk Management, Dated and endorsed on 11 November 2003</p> <p>Provee principios y ejemplos de herramientas para el manejo del riesgo de la calidad que se pueden aplicar a todos los aspectos de la calidad farmacéutica incluidos desarrollo, fabricación, distribución y la inspección durante todo el ciclo de vida de las sustancias farmacéuticas y medicinales, productos farmacéutico, productos biológicos y biotecnológico, incluyendo el uso de materiales, disolventes, excipientes, envasado y etiquetado de materias primas.</p>
ICH Q10	Pharmaceutical Quality System (PQS)
ICH Q11	Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities)

## ANEXO B. REPORTE DE VALIDACIÓN IMPUREZAS ELEMENTALES CLASE 1

### I. Idoneidad del sistema

Una prueba de idoneidad del sistema se realizó antes de la ejecución de cada parámetro de validación analítica con el único propósito de verificar que la concentración obtenida para cada muestra se leyó de forma confiable.

Una solución estándar preparada a 100 % de la solución patrón de trabajo (STD5) se midió usando la concentración obtenida en cada curva de calibración; se calculó el % de recuperación obtenido para la concentración medida frente a la concentración obtenida en la curva de calibración. En todos los casos el valor obtenido fue de entre 80 y 120 %. Intervalo de los resultados para cada analito de interés se presenta en la Tabla B.I.1.

**Tabla B.I.1. Resultados de la Idoneidad del sistema para la clase 1 (% de recobro)**

Analito	Valor más Bajo	Valor más Alto
As	95	107
Cd	97	106
Hg	96	102
Pb	92	103

### II. Estabilidad de las Soluciones

La estabilidad de la Solución Estándar Stock fue examinada por un período de 22 horas después de su preparación. Solución Estándar Stock se almacenó en refrigeración durante todo el período de tiempo evaluado. Una solución estándar al 100% de la concentración de trabajo se preparó a partir de la solución anterior en el momento inicial y 22 horas. El % de recuperación se calculó contra el de una solución estándar fresca preparada para cada período de tiempo.

El resultado obtenido para el % de recuperación se muestra en la Tabla B.II.1 y cumple con las especificaciones de 90-110%.

La estabilidad de la solución estándar de trabajo (STD5) fue examinada por un período de 93 horas después de su preparación. La solución estándar de trabajo se almacenó a temperatura ambiente durante todo el período de tiempo evaluado. La solución estándar de trabajo se evaluó en el momento inicial, 22 y 93 horas. El % de recuperación se calculó contra el de una solución estándar fresca preparada para cada período.

El resultado obtenido para el % de recuperación se muestra en la Tabla B.II.2 y cumple con las especificaciones de 90-110%.

La estabilidad de la solución de muestra del producto A se examinó por un período de 22 horas después de su preparación. La solución muestra se almacenó a temperatura ambiente durante todo el período de tiempo medido y evaluado por duplicado en el momento inicial y 22 horas. La evaluación de la estabilidad de la solución de la muestra se realizó con un número de lote que cuenta con su certificado analítico, preparado en la concentración objetivo. Después de este tiempo, la respuesta de As, Cd, Hg y Pb no aumentaron ni disminuyeron por arriba del límite de cuantificación. Los resultados mostrados en la Tabla B.II.3 demuestran que la solución de muestra es estable durante 26 horas a temperatura ambiente.

**Tabla B.II.1. Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar Stock clase 1 (% de Recobro)**

<b>Tiempo</b>	<b>As</b>	<b>Cd</b>	<b>Hg</b>	<b>Pb</b>
22 horas	96	96	97	120

**Tabla B.II.2. Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar de Trabajo clase 1 (% de Recobro)**

Tiempo	As	Cd	Hg	Pb
22 horas	94	97	96	95
93 horas	100	99	96	97

**Tabla B.II.3. Resultados de la Estabilidad de la Solución Muestra**

Tiempo	Resultado
26 horas	Las respuestas de As, Cd, Hg y Pb no aumentaron ni disminuyeron por arriba del límite de cuantificación

### III. Linealidad

La linealidad de la respuesta para As, Cd, Hg y Pb se determinó con ocho concentraciones que cubren el rango desde límite de detección (LD) hasta el 200% de la concentración objetivo

La solución stock se diluyó en serie con diluyente para producir soluciones que contienen As, Cd, Hg y Pb en los intervalos descritos en las Tablas B.III.1 – B.III.4. Cada solución se inyectó una vez.

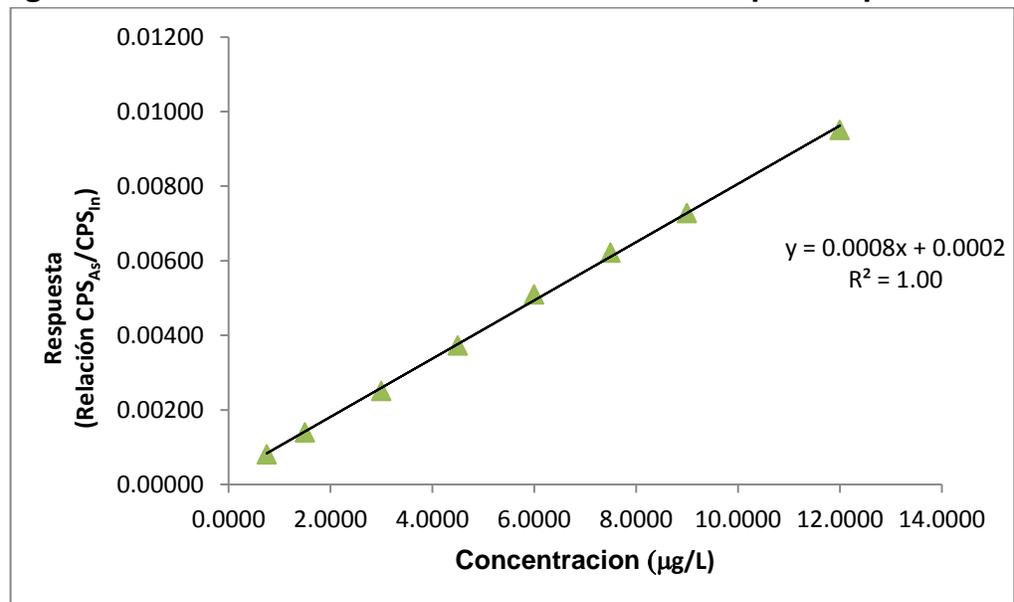
Los resultados se tabulan en las Tablas III.1 – III.4 y los gráficos de relación lineal se muestran en las Figuras B.III.1 – B.III.4. Los análisis de regresión para As, Cd, Hg y Pb muestran coeficientes de determinación que cumplen con la especificación para el valor  $r^2$  de  $\geq 0,99$ , lo que confirma la linealidad del método.

**Tabla B.III.1. Resultados de la Linealidad de la respuesta para As**

% Concentración	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPS <sub>As</sub> /CPS <sub>In</sub> )
LD	0.7500	0.00081
LC	1.5000	0.00140
50	3.0000	0.00251
75	4.5000	0.00373
100	6.0000	0.00510
125	7.5000	0.00622
150	9.0000	0.00728
200	12.0000	0.00951

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura B.III.1. Resultados de la linealidad de la respuesta para As**




---

**Regresión**

---

Constante	0.0002
Coefficiente X	0.0008
r cuadrada	1.00
Observaciones	8

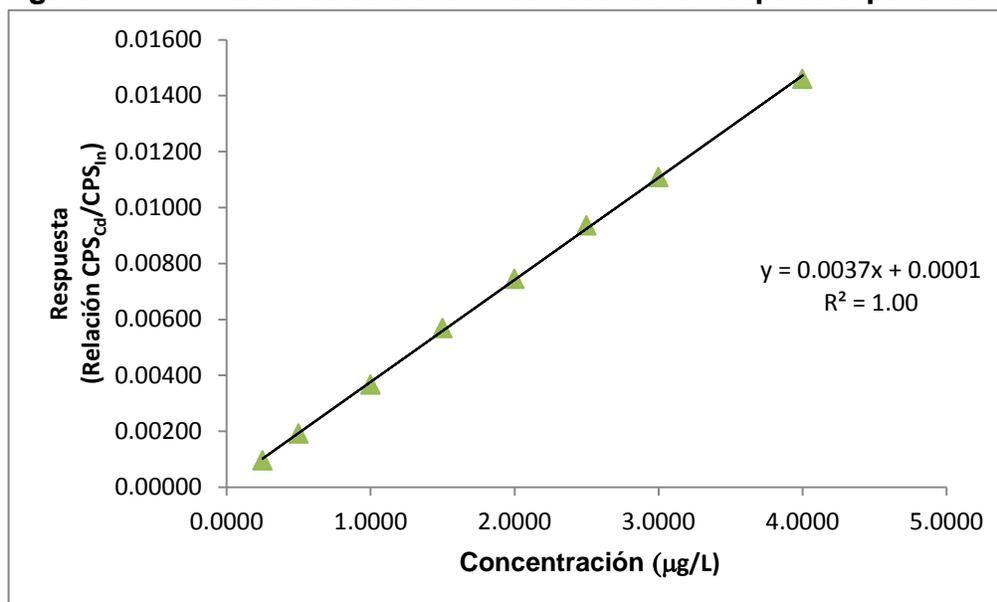
---

**Tabla B.III.2. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Cd**

% Concentración	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPS <sub>Cd</sub> /CPS <sub>In</sub> )
LD	0.2500	0.00096
LC	0.5000	0.00192
50	1.0000	0.00367
75	1.5000	0.00569
100	2.0000	0.00745
125	2.5000	0.00936
150	3.0000	0.01109
200	4.0000	0.01460

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura B.III.2. Resultados de la linealidad de la respuesta para Cd**



**Regresión**

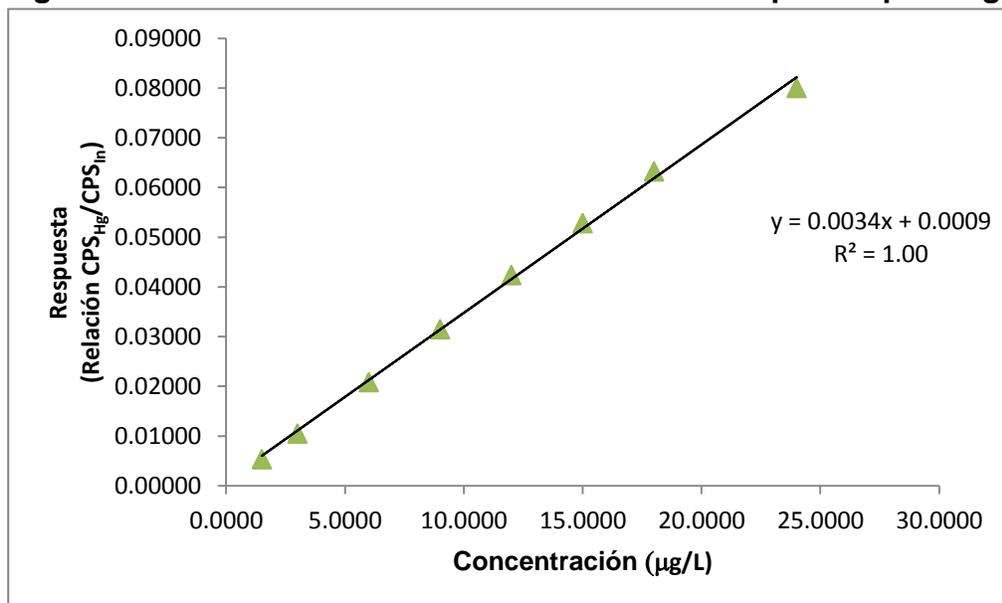
Constante	0.00001
Coefficiente X	0.0037
R cuadrada	1.00
Observaciones	8

**Tabla B.III.3. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Hg**

% Concentración	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPS <sub>Hg</sub> /CPS <sub>In</sub> )
LD	1.5000	0.00537
LC	3.0000	0.01053
50	6.0000	0.02087
75	9.0000	0.03152
100	12.0000	0.04240
125	15.0000	0.05285
150	18.0000	0.06326
200	24.0000	0.08004

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura B.III.3. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Hg**



**Regresión**

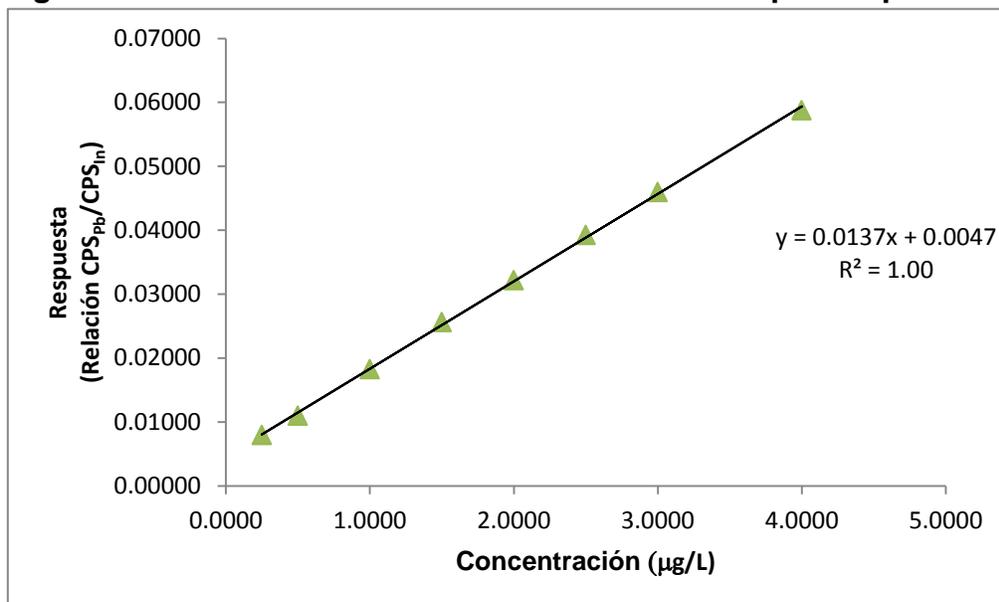
Constante	0.0009
Coefficiente X	0.0034
R cuadrada	1.00
Observaciones	8

**Tabla B.III.4. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Pb**

% Concentración	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPS <sub>Pb</sub> /CPS <sub>In</sub> )
LD	0.2500	0.00797
LC	0.5000	0.01099
50	1.0000	0.01827
75	1.5000	0.02563
100	2.0000	0.03219
125	2.5000	0.03926
150	3.0000	0.04597
200	4.0000	0.05876

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura B.III.4. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Pb**



**Regresión**

Constante	0.0047
Coefficiente X	0.0137
R cuadrada	1.00
Observaciones	8

**IV. Limite de Cuantificación**

La solución al límite de cuantificación (LC) se midió en seis ocasiones. El promedio de la relación de respuesta, % DER de la relación de la respuesta, la concentración en g/L y en ppm de la concentración de la muestra se presenta en la Tabla B.IV.1.

**Tabla B.IV.1. Resultados del Límite de Cuantificación para la clase 1**

<b>Analito</b>	<b>Promedio de la respuesta (Relación <math>CPS_X/CPS_{EI}</math>)</b>	<b>%DER de la respuesta (Relación <math>CPS_X/CPS_{EI}</math>)</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>ppm de la concentración de la muestra</b>
Arsénico	0.00128	2	1.5	0.375
Cadmio	0.00170	3	0.5	0.125
Mercurio	0.00923	0	3.0	0.750
Plomo	0.01836	1	1.0	0.250

Donde: X = analito, EI = Estándar Interno

## V. Límite de Detección

La solución límite de detección (LD) se midió en seis ocasiones. La media de la respuesta, la concentración en  $\mu\text{g/L}$  y en ppm de la concentración de la muestra se presenta en la Tabla B.V.1

**Tabla B.V.1. Resultados del Límite de Detección para la clase 1**

<b>Analito</b>	<b>Promedio de la respuesta (<math>CPS^a</math>)</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>ppm de la concentración de la muestra</b>
Arsénico	2258.03333	0.75	0.1875
Cadmio	3042.61667	0.25	0.0625
Mercurio	16046.06667	1.50	0.3750
Plomo	25732.58333	0.25	0.0625

<sup>a</sup> CPS: Cuentas por Segundo del analito

## VI. Exactitud

Las soluciones muestra fueron adicionadas con As, Cd, Hg y Pb al LC, 100 % y 120 % de la concentración objetivo. En cada nivel de estudio, se evaluaron 3 muestras. Estas soluciones se analizaron junto con una solución de muestra no adicionada y cada % de recobro individual se calculó en base a la cantidad del analito adicionado. También se calculó la media del % de recuperación para cada nivel.

Los resultados, presentados en la Tabla B.VI.1, indican que la concentración de As, Cd, Hg y Pb en la muestra se puede determinar con precisión sobre un intervalo de concentración que varía desde el LC hasta el 120 % de la concentración objetivo. El As, Cd, Hg y Pb cumplen con la especificación para % de recuperación de 70 a 150 % ya que los resultados varían desde 89 % -146 %.

**Tabla B.VI.1. Resultados de la prueba de exactitud para la clase 1**

A: Límite de cuantificación

<b>Analito</b>	<b>% Recobro</b>		
Arsénico	118	Promedio	114
	108		
	115		
Cadmio	100	Promedio	99
	102		
	95		
Mercurio	93	Promedio	95
	93		
	100		
Plomo	97	Promedio	86
	80		
	81		

B: 100%

<b>Analito</b>	<b>% Recobro</b>		
Arsénico	122	Promedio	121
	120		
	120		
Cadmio	96	Promedio	97
	99		
	96		
Mercurio	100	Promedio	97
	92		
	100		
Plomo	82	Promedio	86
	93		
	83		

C: 120%

<b>Analito</b>	<b>% Recobro</b>		
Arsénico	119	Promedio	120
	116		
	126		
Cadmio	95	Promedio	93
	92		
	93		
Mercurio	89	Promedio	89
	88		
	89		
Plomo	85	Promedio	84
	84		
	82		

## **VII. Precisión**

### **Repetibilidad (Analista 1), Día 1, Instrumento 1**

El analista 1 preparó y analizó 6 muestras independientes, las preparaciones fueron adicionadas con As, Cd, Hg y Pb al 100 % de la concentración como se define en el método. Se calculó el % de recobro y el % DER (Desviación Estándar Relativa) de las 6 muestras que se utilizaron para la evaluación de la precisión. Los resultados se presentan en la Tabla B.VII.1. El valor de % de DER para el recobro de As, Cd, Hg y Pb cumple con el requisito de NMT 20 %.

### **Repetibilidad (Analista 2), Día 2, Instrumento 1**

Con el fin de determinar la robustez del método, se realizaron pruebas en días diferentes y por diferentes analistas.

De acuerdo al método se prepararon seis muestras adicionadas con As, Cd, Hg y Pb al 100 % de la concentración objetivo y se analizaron por un segundo analista en un día diferente; en ausencia de un segundo instrumento, se utilizó mismo instrumento usado en la prueba de repetibilidad. Se calculó el % de recuperación y el % DER de las 6 muestras que se utilizaron para la evaluación de la precisión. Los resultados se presentan en la Tabla B.VII.2. El % DER del recobro cumple con el requisito de NMT 20 %.

Se calculó la diferencia absoluta de la media del % de recobro de As, Cd, Hg y Pb obtenidos por los dos analistas para la evaluación de la precisión. Los datos mostrados en la Tabla B.VII.3 demuestran que diferencia absoluta cumple con el requisito de NMT 15 %, lo que demuestra que el método es preciso.

**Tabla B.VII.1. Resultados de la prueba de Repetibilidad para la clase 1**

Número de muestra	% Recobro			
	Arsénico	Cadmio	Mercurio	Plomo
1	121.55	95.64	100.11	82.24
2	120.38	98.91	92.04	93.27
3	120.11	96.20	100.41	83.38
4	119.96	98.46	92.30	82.67
5	120.96	97.95	101.06	85.70
6	122.98	97.73	90.74	83.05
Promedio	120.99	97.48	96.11	85.05
Desv Std.	1.14	1.29	4.88	4.20
% DER	1	1	5	5

**Tabla B.VII.2. Resultados de la prueba de Precisión Intermedia para la clase 1**

Número de muestra	% Recobro			
	Arsénico	Cadmio	Mercurio	Plomo
1	126.89	95.22	89.66	94.34
2	128.29	93.38	88.89	91.88
3	118.27	97.28	88.90	97.25
4	125.54	94.73	88.86	90.22
5	121.79	98.06	91.18	84.59
6	120.40	93.41	89.01	90.00
Promedio	123.53	95.35	89.42	91.38
Desv Std.	3.96	1.96	0.92	4.31
% DER	3	2	1	5

**Tabla B.VII.3. Resultados de la Evaluación de la Precisión para la clase 1**

Analito	Repetibilidad (Analista 1, % de recobro)	Precisión Intermedia (Analista 2, % de recobro)	% Diferencia Absoluta
Arsénico	120.99	123.53	3
Cadmio	97.48	95.35	2
Mercurio	96.11	89.42	7
Plomo	85.05	91.38	6

## VIII. Rango

Los rangos fueron establecidos a partir de los datos de linealidad, exactitud y precisión. Los resultados se presentan en la Tabla B.VIII.1

**Tabla B.VIII.1. Rango**

Elementos	Rango
As	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo
Cd	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo
Hg	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo
Pb	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo

## IX. Robustez

Se realizaron cambios de manera deliberada a los parámetros críticos del método y los resultados se compararon con los obtenidos del método nominal. Tabla B.IX.1

**Tabla B.IX.1. Parámetros evaluados para la prueba de robustez:**

Parámetro	Rango
Temperatura de digestión de la muestra	Temperatura nominal
	Temperatura 1
	Temperatura 2
Tiempo de adquisición de la muestra	Tiempo Nominal
	Tiempo 1
	Tiempo 2

Fueron estudiadas un total de 5 condiciones. La robustez del método se evaluó mediante la realización de la prueba de idoneidad del sistema donde se consideraron la linealidad del método, los porcentajes de recobro para los estándares y los resultados obtenidos para la lectura de la muestra.

Los resultados obtenidos para la  $r^2$ , los porcentajes de recobro de la solución estándar al 100 % (después de los estándares de calibración y al final de la secuencia) y las ppm obtenidas para la muestra se reportan en la Tabla B.IX.II

Los resultados de la curva de calibración, los % de recobro y la concentración As, Cd, Hg y Pb en la muestra cumplen con los criterios descritos en la Tabla B.IX.II, lo que indica que este método no es afectado por las variaciones realizadas en los parámetros del método.

**Tabla B.IX.2. Resultados del estudio de robustez**

Analito	Nominal	Temperatura de digestión		Tiempo de toma de muestra		Criterio
		Temp. 1	Temp. 2	Tiempo 1	Tiempo 2	
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>						
As	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	No menos de 0.99
Cd	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Hg	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Pb	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
<b>% Recobro (después de los estándares de calibración)</b>						
As	103	103	103	102	97	No menos de 80% y no más de 120%
Cd	99	99	99	102	97	
Hg	100	100	100	99	98	
Pb	106	106	106	97	99	
<b>% Recobro (al final de la secuencia)</b>						
As	100	100	100	100	98	No menos de 80% y no más de 120%
Cd	100	100	100	99	98	
Hg	101	101	101	99	101	
Pb	106	106	106	98	100	
<b>ppm en la muestra Producto A</b>						
As	ND	ND	ND	ND	ND	La respuesta de As, Cd, Hg and Pb no aumenta ni disminuye por arriba del límite de cuantificación
Cd	ND	BQL	ND	ND	ND	
Hg	ND	ND	ND	ND	ND	
Pb	BQL	ND	ND	BQL	BQL	

ND= No Detectado

BQL= Por Debajo del Límite de Cuantificación

## ANEXO C. REPORTE DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS ELEMENTALES CLASE 2A POR ICP-MS

### I. Idoneidad del sistema

Una prueba de idoneidad del sistema se realizó antes de la ejecución de cada parámetro de validación analítica con el único propósito de verificar que la concentración obtenida para cada muestra se midió de forma fiable.

Una solución estándar preparada a 100 % de la solución patrón de trabajo se midió usando la concentración obtenida en cada curva de calibración; se calculó el % de recuperación obtenido para la concentración medida frente a la concentración obtenida en la curva de calibración. En todos los casos el valor obtenido fue de entre 80 y 120 %. Intervalo de los resultados para cada analito de interés se presenta en la Tabla C.I.1.

**Tabla C.I.1. Resultados de la Idoneidad del sistema para la clase 2A (% de recobro)**

Analito	Valor más Bajo	Valor más Alto
V	93	102
Co	97	102
Ni	98	105

### II. Estabilidad de las Soluciones

La estabilidad de la Solución Estándar Stock fue examinada por un período de 151 horas después de su preparación. Solución Estándar Stock se almacenó en refrigeración durante todo el período de tiempo evaluado. Una solución estándar al 100% de la concentración de trabajo se preparó a partir de la solución anterior en el momento inicial, 19, 97 y 151 horas. El % de recuperación se calculó contra el de una solución estándar fresca preparada para cada período de tiempo.

El resultado obtenido para el % de recuperación se muestra en la Tabla C.II.1 y cumple con las especificaciones de 90-110%.

La estabilidad de la solución estándar de trabajo fue examinada por un período de 17 horas después de su preparación. La solución estándar de trabajo se almacenó a temperatura ambiente durante todo el período de tiempo evaluado. La solución estándar de trabajo se evaluó en el momento inicial, 13 y 17 horas. El % de recuperación se calculó contra el de una solución estándar fresca preparada para cada período.

El resultado obtenido para el % de recuperación se muestra en la Tabla C.II.2 y cumple con las especificaciones de 90-110%.

La estabilidad de la solución de muestra del producto A se examinó por un período de 22 horas después de su preparación. La solución muestra se almacenó a temperatura ambiente durante todo el período de tiempo medido y evaluado por duplicado en el momento inicial y 22 horas. La evaluación de la estabilidad de la solución de la muestra se realizó con un número de lote que cuenta con su certificado analítico, preparado en la concentración objetivo. Después de este tiempo, la respuesta V, Co y Ni no aumentaron ni disminuyeron por arriba del límite de cuantificación. Los resultados mostrados en la Tabla C.II.3 demuestran que la solución de muestra es estable durante 22 horas a temperatura ambiente.

**Tabla C.II.1. Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar Stock para la clase 2A (% de recobro)**

<b>Tiempo</b>	<b>V</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>
19 horas	98	104	102
97 horas	100	100	99
151 horas	98	102	101

**Tabla C.II.2. Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar de Trabajo para la clase 2A (% de recobro)**

Tiempo	V	Co	Ni
13 horas	105	101	96
17 horas	110	106	105

**Tabla C.II.3. Resultados de la Estabilidad de la Solución Muestra**

Tiempo	Resultado
22 horas	Las respuestas de V, Co y Ni no aumentaron ni disminuyeron por arriba del límite de cuantificación

### III. Linealidad

La linealidad de la respuesta para V, Co y Ni se determinó con ocho concentraciones que cubren el rango desde límite de detección (LD) hasta el 200% de la concentración objetivo

La solución stock se diluyó en serie con diluyente para producir soluciones que contienen V, Co y Ni en los intervalos descritos en las Tablas C.III.1 – C.III.3 Cada solución se inyectó una vez.

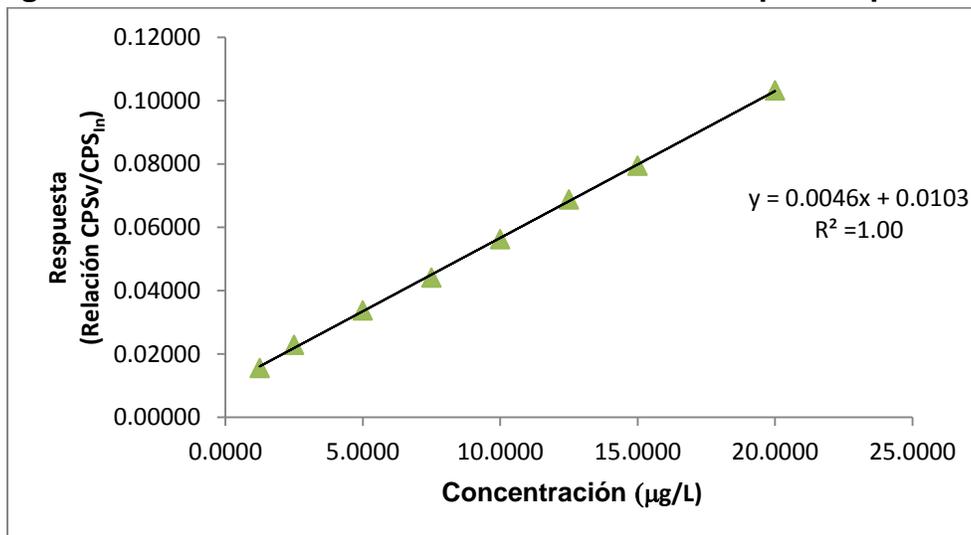
Los resultados se tabulan en las Tablas III.1 – III.3 y los gráficos de relación lineal se muestran en las Figuras C.III.A – C.III.3. Los análisis de regresión para V, Co y Ni muestran coeficientes de determinación que cumplen con la especificación para el valor  $r^2$  de  $\geq 0,99$ , lo que confirma la linealidad del método.

**Tabla C.III.1. Resultados de la Linealidad de la respuesta para V**

% Concentración	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPSv/CPS <sub>in</sub> )
LD	1.2500	0.01561
LC	2.5000	0.02292
50	5.0000	0.03378
75	7.5000	0.04415
100	10.0000	0.05627
125	12.5000	0.06881
150	15.0000	0.07946
200	20.0000	0.10325

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura C.III.1. Resultados de la Linealidad de la respuesta para V**



**Regresión**

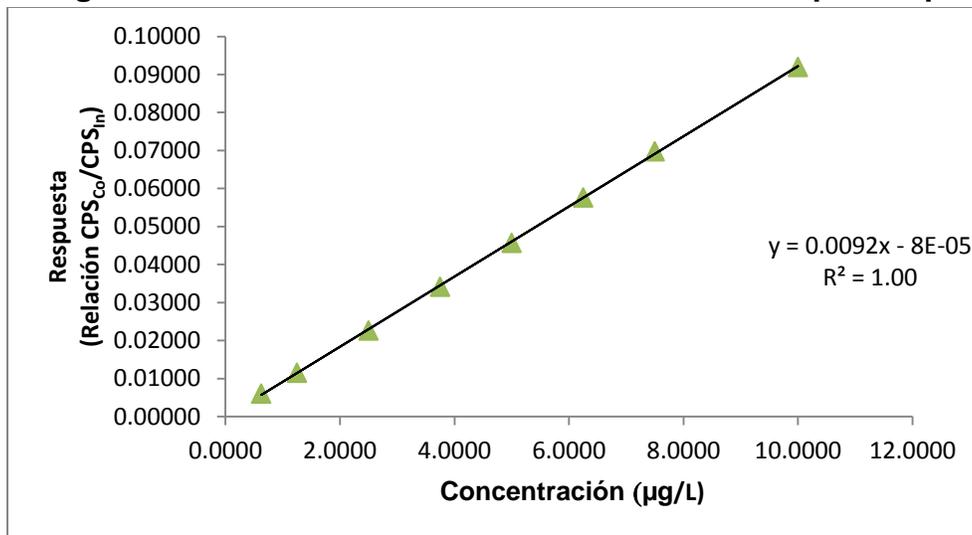
Constante	0.0103
Coefficiente X	0.0046
r cuadrada	1.00
Observaciones	8

**Tabla C.III.2. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Co**

% Concentración Objetivo	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPS <sub>Co</sub> /CPS <sub>In</sub> )
LD	1.2500	0.01561
LC	2.5000	0.02292
50	5.0000	0.03378
75	7.5000	0.04415
100	10.0000	0.05627
125	12.5000	0.06881
150	15.0000	0.07946
200	20.0000	0.10325

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura C.III.2. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Co**



**Regresión**

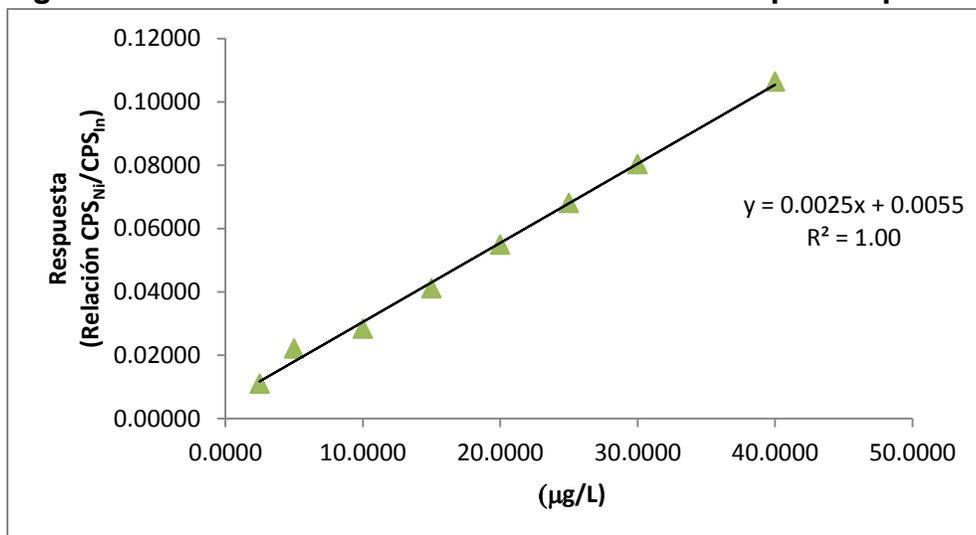
Constante	0.00008
Coefficiente X	0.0092
R cuadrada	1.00
Observaciones	8

**Tabla C.III.3. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Ni**

% Concentración Objetivo	Concentración (µg/L)	Respuesta (Relación CPS <sub>Ni</sub> /CPS <sub>In</sub> )
LD	2.5000	0.01105
LC	5.0000	0.02213
50	10.0000	0.02841
75	15.0000	0.04115
100	20.0000	0.05492
125	25.0000	0.06810
150	30.0000	0.08036
200	40.0000	0.10639

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura C.III.3. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Ni**



**Regresión**

Constante	0.0055
Coefficiente X	0.0025
R cuadrada	1.00
Observaciones	8

**IV. Limite de Cuantificación**

La solución al límite de cuantificación (LC) se midió en seis ocasiones. El promedio de la relación de respuesta, % DER de la relación de la respuesta, la concentración en g/L y en ppm de la concentración de la muestra se presenta en la Tabla C.IV.1.

**Tabla C.IV.1. Resultados del Límite de Cuantificación para la clase 2A**

<b>Analito</b>	<b>Promedio de la respuesta (Relación <math>CPS_X/CPS_{EI}</math>)</b>	<b>%DER de la respuesta (Relación <math>CPS_X/CPS_{EI}</math>)</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>ppm de la concentración de la muestra</b>
Vanadio	0.02386	3	2.5000	2.50
Cobalto	0.01149	1	1.2500	1.25
Níquel	0.01645	1	5.0000	5.00

Donde: X = analito, EI = Estándar Interno

## V. Límite de Detección

La solución límite de detección (LD) se midió en seis ocasiones. La media de la respuesta, la concentración en g/L y en ppm de la concentración de la muestra se presenta en la Tabla C.V.1

**Tabla C.V.1. Resultados del Límite de Detección para la clase 2A**

<b>Analito</b>	<b>Promedio de la respuesta (CPS<sup>a</sup>)</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>ppm de la concentración de la muestra</b>
Vanadio	47426.91667	1.2500	1.250
Cobalto	14946.9000	0.6250	0.625
Níquel	29172.68333	2.5000	2.500

<sup>a</sup> CPS: Cuentas por Segundo del analito

## VI. Exactitud

Las soluciones muestra fueron adicionadas con V, Co y Ni al LC, 100 % y 120 % de la concentración objetivo. En cada nivel de estudio, se evaluaron 3 muestras. Estas soluciones se analizaron junto con una solución de muestra no adicionada y cada % de recobro individual se calculó en base a la cantidad del analito adicionado. También se calculó la media del % de recuperación para cada nivel.

Los resultados, presentados en la Tabla C.VI.1, indican que la concentración de V, Co y Ni en la muestra se puede determinar con precisión sobre un intervalo de concentración que varía desde el LC hasta el 120 % de la concentración objetivo. El vanadio, cobalto y níquel cumplen con la especificación para % de recuperación de 70 a 150 % ya que los resultados varían desde 89 % -146 %.

**Tabla C.VI.1. Resultados de la prueba de Exactitud para la clase 2A**

A: Límite de cuantificación

Analito	% Recobro		
	Vanadio	97	Promedio
106			
103			
Cobalto	101	Promedio	104
	104		
	106		
Níquel	96	Promedio	114
	101		
	146		

B: 100%

Analito	% Recobro		
	Vanadio	91	Promedio

	91		
	91		
Cobalto	91	Promedio	91
	92		
	90		
Níquel	90	Promedio	90
	91		
	89		

C: 120%

Analito	% Recobro		
	Vanadio	102	Promedio
	103		
	103		
Cobalto	102	Promedio	101
	101		
	101		
Níquel	101	Promedio	101
	102		
	100		

## VII. Precisión

### Repetibilidad (Analista 1), Día 1, Instrumento 1

El analista 1 preparó y analizó 6 muestras independientes, las preparaciones fueron adicionadas con V, Co y Ni al 100 % de la concentración como se define en el método. Se calculó el % de recobro y el % DER de las 6 muestras que se utilizaron para la evaluación de la precisión. Los resultados se presentan en la Tabla C.VII.1. El valor de % de DER para el recobro de V, Co y Ni cumple con el requisito de NMT 20 %.

### Repetibilidad (Analista 2), Día 2, Instrumento 1

Con el fin de determinar la robustez del método, se realizaron pruebas en días diferentes y por diferentes analistas.

De acuerdo al método se prepararon seis muestras adicionadas con V, Co y Ni al 100 % de la concentración objetivo y se analizaron por un segundo analista en un día diferente; en ausencia de un segundo instrumento, se utilizó mismo instrumento usado en la prueba de repetibilidad. Se calculó el % de recuperación y el % DER de las 6 muestras que se utilizaron para la evaluación de la precisión. Los resultados se presentan en la Tabla C.VII.2.

El %DER del recobro cumple con el requisito de NMT 20 %.

La calculo la diferencia absoluta de la media del % de recobro de V, Co y Ni para la evaluación de la precisión. Los datos mostrados en la Tabla C.VII.3 demuestran que diferencia absoluta cumple con el requisito de NMT 15 %, lo que demuestra que el método es preciso.

**Tabla C.VII.1. Resultados de la prueba de Repetibilidad para la clase 2A**

% Recobro			
Número de muestra	Vanadio	Cobalto	Níquel
1	91.37	91.36	89.59
2	91.08	91.58	91.33
3	91.01	90.47	88.83
4	91.57	92.21	89.91
5	93.19	91.48	92.62
6	93.28	91.61	91.31
Promedio	91.92	91.45	90.60
Desv. Std	1.04	0.56	1.40
% DER	1	1	2

**Tabla C.VII.2. Resultados de la prueba de Precisión Intermedia para la clase 2A**

% Recobro			
Número de muestra	Vanadio	Cobalto	Níquel

1	103.83	102.22	99.95
2	103.60	102.46	100.83
3	103.40	102.84	99.92
4	103.23	101.72	99.52
5	103.67	102.55	99.33
6	105.54	103.65	102.01
Promedio	103.88	102.57	100.26
Desv. Std	0.84	0.65	1.00
% DER	1	1	1

**Tabla C.VII.3. Evaluación de la Precisión para la clase 2A**

<b>Analito</b>	<b>Repetibilidad (Analista 1, % de recobro)</b>	<b>Precisión Intermedia (Analista 2, % de recobro)</b>	<b>%Diferencia Absoluta</b>
Vanadio	91.92	103.88	12
Cobalto	91.45	102.57	11
Níquel	90.60	100.26	10

## VIII. Rango

Los rangos fueron establecidos a partir de los datos de linealidad, exactitud y precisión. Los resultados se presentan en la Tabla C.VIII.1

**Tabla C.VIII.1. Rango**

<b>Elementos</b>	<b>Rango</b>
V	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo
Co	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo
Ni	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo

## IX. Robustez

Se realizaron cambios de manera deliberada a los parámetros críticos del método y los resultados se compararon con los obtenidos del método nominal. Tabla C.IX.1

**Tabla C.IX.1. Parámetros evaluados para la prueba de robustez:**

Parámetro	Rango
Temperatura de digestión de la muestra	Temperatura nominal
	Temperatura 1
	Temperatura 2
Tiempo de adquisición de la muestra	Tiempo Nominal
	Tiempo 1
	Tiempo 2

Fueron estudiadas un total de 5 condiciones. La robustez del método se evaluó mediante la realización de la prueba de idoneidad del sistema donde se consideraron la linealidad del método, los porcentajes de recobro para los estándares y los resultados obtenidos para la lectura de la muestra.

Los resultados obtenidos para la  $r^2$ , los porcentajes de recobro de la solución estándar al 100 % (después de los estándares de calibración y al final de la secuencia) y las ppm obtenidas para la muestra se reportan en la Tabla C.IX.2

**Tabla C.IX.2. Resultados del estudio de robustez de la clase 2A**

Analito	Nominal	Temperatura de digestión		Tiempo de toma de muestra		Criterio
		Temp. 1	Temp. 2	Tiempo 1	Tiempo 2	
<b>Coefficiente de Determinación (<math>r^2</math>)</b>						
V	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	No menos de 0.99
Co	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Ni	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
<b>% Recobro (después de los estándares de calibración)</b>						
V	99	99	99	98	98	No menos de 80% y no más de 120%
Co	100	100	100	99	98	
Ni	101	101	101	104	102	
<b>% Recobro (al final de la secuencia)</b>						
V	100	100	100	99	99	No menos de 80% y no más de 120%
Co	99	99	99	98	97	
Ni	99	99	99	103	102	
<b>ppm in the sample Producto A</b>						
V	ND	ND	ND	ND	ND	La respuesta de V, Co y Ni no aumenta ni disminuye por arriba del límite de cuantificación
Co	ND	ND	ND	ND	ND	
Ni	ND	ND	ND	ND	ND	

ND= No Detectado

Los resultados de la curva de calibración, los % de recobro y la concentración de V, Co y Ni en la muestra cumplen con los criterios descritos en la Tabla C.IX.II, lo que indica que este método no es afectado por las variaciones realizadas en los parámetros del método.

## ANEXO D. REPORTE DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PALADIO POR ICP-MS

### I. Idoneidad del sistema

Una prueba de idoneidad del sistema se realizó antes de la ejecución de cada parámetro de validación analítica con el único propósito de verificar que la concentración obtenida para cada muestra se midió de forma fiable.

Una solución estándar preparada a 100 % de la solución patrón de trabajo (STD5) se midió usando la concentración obtenida en cada curva de calibración; se calculó el % de recuperación obtenido para la concentración medida frente a la concentración obtenida en la curva de calibración. En todos los casos el valor obtenido fue de entre 80 y 120 %. Intervalo de los resultados para cada analito de interés se presenta en la Tabla D.I.1.

**Tabla D.I.1. Resultados de la Idoneidad del sistema para Pd (% de recobro)**

Analito	Valor más Bajo	Valor más Alto
Pd	98	107

### II. Estabilidad de las Soluciones

La estabilidad de la Solución Estándar Stock fue examinada por un período de 93 horas después de su preparación. Solución Estándar Stock se almacenó en refrigeración durante todo el período de tiempo evaluado. Una solución estándar al 100% de la concentración de trabajo se preparó a partir de la solución anterior en el momento inicial, 23 y 93 horas. El % de recuperación se calculó contra el de una solución estándar fresca preparada para cada período de tiempo.

El resultado obtenido para el % de recuperación se muestra en la Tabla D.II.1 y cumple con las especificaciones de 90-110%.

La estabilidad de la solución estándar de trabajo (STD5) fue examinada por un período de 92 horas después de su preparación. La solución estándar de trabajo se almacenó a temperatura ambiente durante todo el período de tiempo evaluado. La solución estándar de trabajo se evaluó en el momento inicial, 21 y 92 horas. El % de recuperación se calculó contra el de una solución estándar fresca preparada para cada período.

El resultado obtenido para el % de recuperación se muestra en la Tabla D.II.2 y cumple con las especificaciones de 90-110%.

La estabilidad de la solución de muestra del producto A se examinó por un período de 92 horas después de su preparación. La solución muestra se almacenó a temperatura ambiente durante todo el período de tiempo medido y evaluado por duplicado en el momento inicial, 21 y 92 horas. La evaluación de la estabilidad de la solución de la muestra se realizó con un número de lote que cuenta con su certificado analítico, preparado en la concentración objetivo. Después de este tiempo, la respuesta de Pd no aumentó ni disminuyó por arriba del límite de cuantificación. Los resultados mostrados en la Tabla D.II.3 demuestran que la solución de muestra es estable durante 92 horas a temperatura ambiente.

**Tabla D.II.1. Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar Stock de Pd (% de recobro)**

<b>Tiempo</b>	<b>Pd</b>
93 horas	101

**Tabla D.II.2. Resultados de la Estabilidad de la Solución Estándar de Trabajo de Pd (% de recobro)**

Tiempo	Pd
92 horas	98

**Tabla D.II.3. Resultados de la Estabilidad de la Solución Muestra**

Tiempo	Resultado
92 horas	La respuesta de Pd no aumenta ni disminuye por arriba del límite de cuantificación

### **III. Linealidad**

La linealidad de la respuesta para Pd se determinó con ocho concentraciones que cubren el rango desde límite de detección (LD) hasta el 200% de la concentración objetivo

La solución stock se diluyó en serie con diluyente para producir soluciones que contienen Pd en los intervalos descritos en la Tabla D.III.1 Cada solución se inyectó una vez.

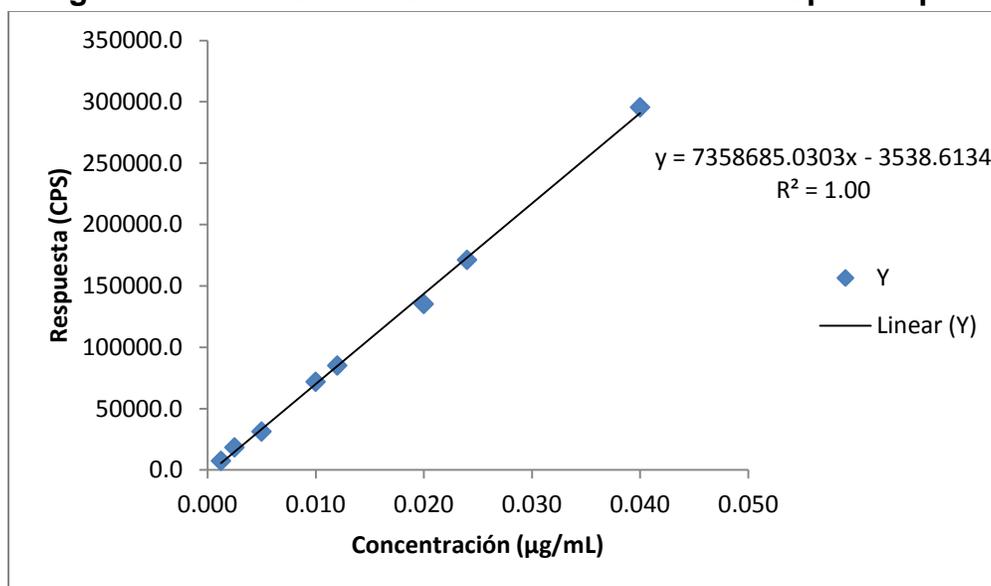
Los resultados se tabulan en las Tabla D.III.1 y el gráfico de relación lineal se muestra en las Figura D.III.A. El análisis de regresión para Pd muestra un coeficiente de determinación que cumple con la especificación para el valor  $r^2$  de  $\geq 0,99$ , lo que confirma la linealidad del método.

**Tabla D.III.1. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Pd**

% Concentración	Concentración (µg/mL)	Respuesta (CPS)
LD	0.00125	7425.00000
LC	0.00250	18390.40000
25	0.00500	31325.90000
50	0.01000	71854.60000
60	0.01200	85121.50000
100	0.02000	135244.70000
120	0.02400	171213.50000
200	0.04000	295524.60000

CPS: Cuentas por segundo del analito

**Figura D.III.1. Resultados de la Linealidad de la respuesta para Pd**



**Regresión**

Constante	-3538.6134
Coefficiente X	7358685.0303
r cuadrada	1.00
Observaciones	8

#### IV. Limite de Cuantificación

La solución al límite de cuantificación (LC) se midió en seis ocasiones. El promedio de la relación de respuesta, % DER de la relación de la respuesta, la concentración en g/L y en ppm de la concentración de la muestra se presenta en la Tabla D.IV.1.

**Tabla D.IV.1. Resultados del Límite de Cuantificación para Pd**

Analito	Promedio de la respuesta (CPS)	%DER de la respuesta	Concentración (µg/L)	ppm de la concentración de la muestra
Paladio	17843.5	3	2.50	2.50

CPS: Cuentas por segundo del analito

#### V. Limite de Detección

La solución límite de detección (LD) se midió en seis ocasiones. La media de la respuesta, la concentración en g/L y en ppm de la concentración de la muestra se presenta en la Tabla D.V.1

**Tabla D.V.1. Resultados del Límite de Detección para Pd**

Analito	Promedio de la respuesta (CPS)	Concentración (µg/L)	ppm de la concentración de la muestra
Paladio	7147.03333	1.25	1.25

CPS: Cuentas por segundo del analito

#### VI. Exactitud

Las soluciones muestra fueron adicionadas con Pd al LC, 100 % y 120 % de la concentración objetivo. En cada nivel de estudio, se evaluaron 3 muestras. Estas soluciones se analizaron junto con una solución de muestra no adicionada y cada % de recobro individual se calculó en base a la cantidad del analito adicionado. También se calculó la media del % de recuperación para cada nivel.

Los resultados, presentados en la Tabla D.VI.1, indican que la concentración de Pd en la muestra se puede determinar con precisión sobre un intervalo de concentración que varía desde el LC hasta el 120 % de la concentración objetivo. El paladio cumple con la especificación para el % de recuperación de 70 a 150 % ya que los resultados varían desde 91 % - 109 %.

**Tabla D.VI.1. Resultados de la prueba de Exactitud para Pd**

A: Límite de cuantificación

<b>Analito</b>	<b>% Recobro</b>		
Paladio	79	Promedio	79
	78		
	80		

B: 100%

<b>Analito</b>	<b>% Recobro</b>		
Paladio	97	Promedio	96
	95		
	96		

C: 120%

<b>Analito</b>	<b>% Recobro</b>		
Paladio	97	Promedio	96
	95		
	95		

## **VII. Precisión**

### **Repetibilidad (Analista 1), Día 1, Instrumento 1**

El analista 1 preparó y analizó 6 muestras independientes, las preparaciones fueron adicionadas con Pd al 100 % de la concentración como se define en el método. Se calculó el % de recobro y el % DER de las 6 muestras que se utilizaron para la evaluación de la precisión. Los resultados se presentan en la Tabla D.VII.1. El valor de % de DER para el recobro de Pd cumple con el requisito de NMT 20 %.

### **Repetibilidad (Analista 2), Día 2, Instrumento 1**

Con el fin de determinar la robustez del método, se realizaron pruebas en días diferentes y por diferentes analistas

De acuerdo al método se prepararon seis muestras adicionadas con Pd al 100 % de la concentración objetivo y se analizaron por un segundo analista en un día diferente; en ausencia de un segundo equipo, se utilizó mismo equipo usado en la prueba de repetibilidad. Se calculó el % de recuperación y el % de DER de las 6 muestras que se utilizaron para la evaluación de la precisión. Los resultados se presentan en la Tabla D.VII.2. El %DER del recobro cumple con el requisito de NMT 20 %.

La calculo la diferencia absoluta de la media del % de recobro de Pd para la evaluación de la precisión. Los datos mostrados en la Tabla D.VII.3 demuestran que diferencia absoluta cumple con el requisito de NMT 15 %, lo que demuestra que el método es preciso.

**Tabla D.VII.1. Resultados de la prueba de Repetibilidad para Pd**

<b>% RECOBRO</b>	
<b>Número de muestra</b>	<b>Paladio</b>
1	96.76
2	94.98
3	95.83
4	94.76
5	94.00
6	95.92
Promedio	95.38
Desv. Std	0.98
% DER	1

**Tabla D.VII.2. Resultados de la prueba de Precisión Intermedia para Pd**

<b>% RECOBRO</b>	
<b>Número de muestra</b>	<b>Paladio</b>
1	101.63
2	100.63
3	97.37
4	98.87
5	95.56
6	94.33
Promedio	98.07
Desv. Std	2.85
% DER	3

**Tabla D.VII.3. Evaluación de la Precisión para Pd**

<b>Analito</b>	<b>Repetibilidad (Analista 1, % de recobro)</b>	<b>Precisión Intermedia (Analista 2, % de recobro)</b>	<b>%Diferencia Absoluta</b>
Paladio	95.38	98.07	3

## VIII. Rango

Los rangos fueron establecidos a partir de los datos de linealidad, exactitud y precisión. Los resultados se presentan en la Tabla D.VIII.1

**Tabla D.VIII.1. Rango**

Elementos	Rango
Pd	LC-120 % de la concentración del estándar de trabajo

## IX. Robustez

Se realizaron cambios de manera deliberada a los parámetros críticos del método y los resultados se compararon con los obtenidos del método nominal. Tabla D.IX.1

**Tabla D.IX.1. Parámetros evaluados para la prueba de robustez:**

Parámetro	Rango
Temperatura de digestión de la muestra	Temperatura nominal
	Temperatura 1
	Temperatura 2
Tiempo de adquisición de la muestra	Tiempo Nominal
	Tiempo 1
	Tiempo 2

Fueron estudiadas un total de 5 condiciones. La robustez del método se evaluó mediante la realización de la prueba de idoneidad del sistema donde se consideraron la linealidad del método, los porcentajes de recobro para los estándares y los resultados obtenidos para la lectura de la muestra.

Los resultados obtenidos para la  $r^2$ , los porcentajes de recobro de la solución estándar al 100 % (después de los estándares de calibración y al final de la secuencia) y las ppm obtenidas para la muestra se reportan en la Tabla D.IX.2

**Tabla D.IX.2. Resultados del estudio de robustez**

Analito	Nominal	Temperatura de digestión		Tiempo de toma de muestra		Criterio
		Temp. 1	Temp. 2	Tiempo 1	Tiempo 2	
<b>Coefficiente de Determinación (<math>r^2</math>)</b>						
Pd	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	No menos de 0.99
<b>% Recobro (después de los estándares de calibración)</b>						
Pd	103	104	104	104	101	No menos de 80% y no más de 120%
<b>% Recobro (al final de la secuencia)</b>						
Pd	106	98	98	103	100	No menos de 80% y no más de 120%
<b>ppm en la muestra Producto A</b>						
Pd	1.32	0.98	0.96	2.14	1.44	La respuesta de V, Co y Ni no aumenta ni disminuye por arriba del límite de cuantificación

ND= No Detectado

BQL= Por Debajo del Límite de Cuantificación

## **ANEXO E. TOXICOLOGÍA** <sup>12</sup>

### **Arsénico**

El arsénico (As) es ubicuo en el medio ambiente y en los alimentos, el suelo, el agua potable y en el aire.

El arsénico inorgánico se puede presentar en su forma trivalente (por ejemplo, trióxido de arsénico, arsenito de sodio) o pentavalente (arseniato de sodio, pentóxido de arsénico, ácido arsénico). Hasta el momento no se conoce una función biológica del arsénico en los organismos humanos o de mamíferos. Por esta razón, esta evaluación se centra en el arsénico inorgánico, que es más relevante en los productos farmacéuticos.

El arsénico inorgánico ha demostrado ser genotóxico, pero no mutagénico y ha sido reconocido como un carcinógeno humano.

Debido a su naturaleza ubicua y perfil de toxicidad, ha habido muchas evaluaciones de riesgos realizadas sobre el arsénico y sus compuestos que utilizan modelos lineales de dosis respuesta.

La mayor parte los efectos del arsénico en los seres humanos no se han podido reproducir en los animales, por lo que el riesgo en las evaluaciones depende en gran medida de los datos epidemiológicos de poblaciones con exposición a altas concentraciones de arsénico. En los seres humanos, tanto los efectos cancerosos y como los no cancerosos están relacionados con la exposición al arsénico. La exposición oral se ha relacionado con cáncer en la piel, hígado, pulmón, riñón y vejiga. Después de la exposición por inhalación existe evidencia de un mayor riesgo de cáncer de pulmón.

La piel (despigmentación, queratosis palmoplantar) y el tracto gastrointestinal (por ejemplo, náuseas) parecen ser los objetivos más sensibles a los efectos adversos no cancerígenos después de la ingestión oral, mientras que la enfermedad

vascular, efectos reproductivos y efectos neurológicos también se reportan como puntos terminales no oncológicos.

Los estudios en poblaciones grandes (~40000 habitantes) expuestos a concentraciones de arsénico en el agua de pozo a 1000  $\mu\text{g} / \text{L}$  y más alto en el suroeste de China Taipei han sido la base de las evaluaciones de riesgo de cáncer de piel, y más recientemente, de la vejiga y el cáncer de pulmón (US EPA, 2010).

### **PDE exposición oral**

El PDE oral se basa en los efectos crónicos de arsénico en la piel y establece el límite en 15  $\mu\text{g} / \text{día}$  basado en los valores que reporta la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR).

### **PDE - La exposición parenteral**

La biodisponibilidad oral de arsénico es de  $\approx 95\%$ . La evidencia más directa es a partir de un estudio que evaluó la eliminación del arsénico en 6 días en los seres humanos sanos que recibieron agua con una alta concentración de arsénico (especies de arsénico no especificadas) y la absorción reportada es de aproximadamente el 95%. Por lo tanto la PDE es idéntica a la PDE oral. PDE = 15  $\mu\text{g} / \text{día}$ .

### **PDE – Exposición por Inhalación**

El aumento del riesgo de cáncer de pulmón y otras enfermedades respiratorias se han reportado después de la exposición por inhalación de los trabajadores en el ámbito ocupacional. La justificación para establecer la PDE por inhalación en valores de 1.9  $\mu\text{g} / \text{día}$ , es la relativa falta de información sobre la extrapolación lineal de la dosis en comparación con la exposición oral.

## **Cadmio**

Cadmio (Cd) es un metal de transición, cuyo isótopo más abundante de origen natural es no radiactivo. Se encuentra en la naturaleza en formas minerales y se obtiene para uso comercial principalmente a partir de mineral de cadmio. El cadmio existe en forma de sal solamente en el estado de oxidación (+2).

Algunas sales de cadmio, tales como cloruro de cadmio, sulfato de cadmio y el nitrato de cadmio son solubles en agua; otras sales insolubles pueden llegar a ser más solubles por la interacción con ácidos, la luz o el oxígeno.

El cadmio, óxido de cadmio, sales de cadmio con borosilicatos se utilizan como catalizadores en síntesis orgánica, las aleaciones de cadmio/plata se utilizan en la hidrogenación selectiva de compuestos de carbonilo.

Se ha demostrado que el cadmio es genotóxico, pero no mutagénico y ha sido reconocido como carcinógeno en seres humanos. El cadmio y sus compuestos son causantes de cáncer de pulmón.

Además, se han observado asociaciones positivas entre la exposición al cadmio y los compuestos de cadmio como cáncer del riñón y de próstata.

Evidencia de numerosos estudios epidemiológicos que evalúan la exposición por inhalación a cadmio (tanto vía ocupacional como por rutas medioambientales) han demostrado un mayor riesgo de desarrollar cáncer (sobre todo de pulmón) que se correlaciona con la exposición por inhalación a cadmio.

### **PDE - Exposición oral**

Un punto final sensible para la exposición oral a sales de cadmio es la toxicidad renal. Efectos esqueléticos y renales se observan a niveles de exposición similares y son un marcador sensible de la exposición al cadmio.

Una serie de estudios de exposición oral de cadmio en ratas y ratones no mostraron evidencia de carcinogenicidad, por lo tanto se usó el criterio de

valoración de la toxicidad renal para establecer la PDE oral para el cadmio, siguiendo las recomendaciones de la ATSDR.

PDE = 5 µg / día

### **PDE - La exposición parenteral**

Un estudio de 12 semanas en ratas que recibieron inyecciones diarias subcutáneas de 0.6 mg / kg de Cd, 5 días a la semana mostraron daño renal en la semana 7 y versiones posteriores (Prozialeck et al, 2009). Para este estudio se utilizó un solo nivel de dosis.

El LOAEL de este estudio es de 0,6 mg / kg en base a una disminución del peso corporal, aumento del volumen de orina y biomarcadores urinarios visto en este nivel de dosis. Este estudio se utilizó para establecer la PDE parenteral. En un estudio de dosis única independiente donde a las ratas se les administraron 0, 1, 2, 4, 8, 16 o 32 mmol / kg de CdCl<sub>2</sub> por vía subcutánea, se observaron sarcomas en el sitio de inyección en las dos dosis más altas al final del período de observación de 72 semanas (Waalkes et al, 1999). No está claro si los granulomas presentes en los sitios de inyección se deben al tiempo o a una cantidad no especificada del cadmio administrado en el lugar de la inyección.

PDE = 1.7 µg / día

### **PDE – Exposición por Inhalación**

Usando la unidad de riesgo de inhalación de 0.0018 / µg / m<sup>3</sup> que viene para el cadmio y un nivel de riesgo de 1: 100000, la PDE por inhalación se puede calcular como sigue:

$$\text{Inhalación PDE} = \frac{1 \times 10^{-5}}{1,8 \times 10^{-3} \text{ µg / m}^3} = 5.55 \times 10^{-2}$$

$$\text{PDE} = 0,056 \text{ µg / m}^3 / 1000 \text{ L/m}^3 \times 28800 \text{ L / d} = 1.7 \text{ µg / día}$$

## **Plomo**

Plomo (Pb) está presente en las formas orgánicas e inorgánicas. Los compuestos de plomo bivalentes generalmente incluyen tanto sales solubles en agua como acetato de plomo, así como sales insolubles como óxidos de plomo. Los aditivos de la gasolina incluyen compuestos orgánicos de plomo como el tetrametil-plomo y el tetraetilo de plomo. Los compuestos orgánicos de plomo sufren una degradación relativamente rápida en la atmósfera y forman compuestos inorgánicos de plomo persistentes en agua y suelo. El plomo no tiene ninguna función biológica conocida en el organismo humano o de mamíferos.

En los seres humanos y los animales, la exposición al plomo puede causar efectos en la salud como pueden ser neurológicos, reproductivos, de desarrollo, inmunológicos, cardiovasculares y renales. En general, la sensibilidad a la toxicidad del plomo es mayor cuando hay una exposición en el útero y en los niños en comparación con adultos. El objetivo a nivel sanguíneo se estableció en 1-2  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , usando programas de modelación que suponen el 100% de biodisponibilidad se obtuvo una PDE. Por esta razón, las PDE's son los mismos independientemente de la vía de administración.

### **PDE – exposición oral**

Los efectos neuroconductuales adversos son considerados como el punto final más sensible y más relevante en los seres humanos después de una exposición oral. Los datos de estudios epidemiológicos muestran que los niveles de plomo en sangre  $< 5 \mu\text{g}/\text{dL}$  puede estar asociada con déficits neuroconductuales en niños.

De acuerdo con el modelo estadounidense EPA, la ingesta oral de  $5 \mu\text{g}/\text{día}$  con un 100% de absorción se traduce a un nivel de plomo en la sangre de 1-2  $\mu\text{g}/\text{dL}$  para niños de 0-7 años

PDE=  $5.0 \mu\text{g}/\text{día}$

### **PDE- exposición parental**

Los efectos orales están basados sobre los niveles de plomo en la sangre. Por lo tanto la PDE parental es igual a la PDE oral.

PDE= 5.0 µg/día

### **PDE – exposición por inhalación**

Los efectos orales están basados en los niveles de plomo en la sangre. Por lo tanto, la PDE por inhalación es igual a la PDE oral

PDE= 5.0 µg/día

### **Mercurio**

Mercurio (Hg) se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente mundial. El mercurio existe en tres formas: mercurio elemental, el mercurio inorgánico y el mercurio orgánico. La forma más probable de mercurio residual en productos de drogas es la forma inorgánica. Por lo tanto, esta evaluación de la seguridad se basa en datos toxicológicos de mercurio elemental o inorgánico. Esta evaluación de la seguridad y la PDE derivados no aplican al mercurio orgánico.

No hay datos que indiquen que el mercurio inorgánico es cancerígeno en humanos. La evidencia está limitada a la experimentación en animales para demostrar la carcinogenicidad del cloruro de mercurio. La agencia internacional para la investigación del cáncer concluyó que los compuestos inorgánicos del mercurio no son clasificables como carcinogénicos en humanos

Los compuestos de mercurio inorgánico muestran significativamente más baja biodisponibilidad oral en comparación con el mercurio orgánico e inducen diferentes efectos toxicológicos, como neurológico, corrosivo, hematopoyético, y los efectos renales y enfermedades cutáneas (acrodinia).

La toxicidad limitante de seguridad para el mercurio inorgánico y las sales de mercurio es la toxicidad renal. Se ha informado absorción directa al cerebro a través de la vía olfativa

### **PDE - Exposición oral**

Se realizaron estudios NTP de hasta 2 años de duración de  $\text{HgCl}_2$  en ratas y ratones. Se seleccionó un estudio de 6 meses de alimentación forzada en ratas porque tenía una evaluación patológica clínica más detallada y una gama más amplia de dosis (0,312 a 5 mg  $\text{HgCl}_2/\text{kg}/5\text{d}$  por semana). De manera absoluta y relativa (en relación peso corporal) el peso de los riñones se incrementaron 0,625 mg / kg. En todos los varones dosificados se observaron algunos cambios en los parámetros químicos clínicos tales como disminución de creatinina, potasio, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa. Los resultados no parecen dependientes de la dosis. Un incremento en la incidencia y la gravedad (de mínima a leve) en la nefropatía se observó desde 0,625 mg  $\text{HgCl}_2$ . Por lo cual la PDE se fijó en 30  $\mu\text{g}$  / día.

### **PDE - La exposición parenteral**

Los estudios en animales indican que la biodisponibilidad oral de mercurio inorgánico está en el intervalo de 10-30%. Por lo tanto, la PDE parenteral se calculó dividiendo la PDE oral mediante un factor de modificación de 10.

$$\text{PDE} = 30 \mu\text{g} / \text{día} / 10 = 3,0 \mu\text{g} / \text{día}$$

### **PDE - Exposición Inhalación**

Los efectos neuroconductuales se consideran que son el punto final más sensible después de la exposición por inhalación en los seres humanos como se muestra en estudios ocupacionales en el rango de niveles de TWA de aire entre 14 y 20  $\mu\text{g} / \text{m}^3$ . La presencia de efectos neuroconductuales a bajos niveles de exposición de mercurio (14  $\mu\text{g} / \text{m}^3$ ) en dentistas indican que el TWA necesita ser considerado como un LOAEL.

$$\text{PDE } 1.2 \text{ g/día}$$

## **Níquel**

Níquel (Ni) es un elemento del Grupo 10 de la primera serie de transición. Aunque níquel puede existir en los estados de oxidación 0, 1, 2 y 3, su estado de oxidación principal es 2. El níquel es un metal natural existente en diversas formas minerales. En general, los compuestos de níquel se agrupan basándose en la solubilidad en agua, y los compuestos de níquel más solubles, incluyendo cloruro de níquel, sulfato de níquel, y nitrato de níquel, tienden a ser más tóxicos que formas menos solubles, tales como el óxido de níquel y subsulfuro de níquel. El níquel no es nutricionalmente esencial para los humanos, pero la deficiencia de níquel puede causar efectos adversos en animales. Las aleaciones de níquel como Ni-Al se utilizan como catalizadores en reacciones de hidrogenación.

El acero inoxidable es una aleación a base de hierro que contiene cromo y también pueden contener <1-38% de níquel como un óxido. La ingesta diaria de níquel oscila desde 100 hasta 300 µg / día.

### **Seguridad - toxicidad limitante**

El níquel es genotóxico, pero no mutagénico. No hay indicios de carcinogenicidad después de la administración oral de sales de níquel. Los estudios en roedores muestran que dependiendo del tipo de sal de níquel que inhalaron hubo un aumento en los tumores. La EPA en los Estados Unidos llegó a la conclusión de que existen pruebas suficientes para determinar que el polvo de la refinería de níquel es carcinogénico.

En contraste con el polvo de la refinería de níquel, no se encontró en las personas que trabajaban con aleaciones de níquel o en la producción de acero inoxidable un aumento significativo en el riesgo de cáncer. Todas las combinaciones de las formas de níquel fueron clasificadas como un carcinógeno humano.

En los seres humanos y los animales, la ingestión de grandes cantidades de níquel puede causar dolor de estómago, depresión del peso corporal y los efectos

adversos en la sangre y los riñones. Los humanos generalmente se sensibilizan al níquel después de un contacto prolongado con la piel.

Datos en humanos demuestran que un desafío oral a una dosis única de níquel administrado en el agua potable puede provocar dermatitis en personas sensibilizadas al níquel. En la derivación de la dosis de referencia oral para las sales solubles de níquel, no se tomaron en cuenta a los individuos con hipersensibilidad al níquel. La inhalación crónica puede producir cambios adversos tales como la inflamación en el pulmón y de la cavidad nasal en seres humanos y animales; enfermedades como bronquitis, enfisema, fibrosis y daños en la función pulmonar se han reportado en los trabajadores de soldadura y fundición de níquel.

Las lesiones pulmonares inflamatorias que se desarrollaron en ratas administradas con sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ) soluble fueron cualitativamente similares, pero menos graves que los que se producen en ratas administradas con el óxido de níquel ( $\text{NiO}$ ) insoluble. La toxicidad de níquel parece ser mayor para las formas solubles, que son las que se absorben más rápidamente de los pulmones.

### **PDE - Exposición oral**

En un estudio de carcinogenicidad con duración de 2 años en ratas administradas con sulfato de níquel hexahidratado en niveles de 10, 30 o 50 mg / kg / día, no se observaron tumores relacionados con el tratamiento. Hubo una respuesta significativa en la mortalidad de las mujeres expuestas durante las semanas 0 a la 105 en todos los niveles de dosis, y una disminución en el peso en ambos sexos en la semana 103 dependiente de la dosis que alcanzan la significación en los grupos de 30 y 50 mg / kg / día.

La PDE oral es 220  $\mu\text{g}$  / día

### **PDE - La exposición parenteral**

Un estudio en humanos utilizando un isótopo estable de níquel estima que fue absorbido 29-40% de lo indicado en la etiqueta (Basado en los datos de la

excreción fecal). Otro estudio evaluó el efecto de los alimentos sobre la absorción de níquel y demostró que entre 2-23% de la dosis administrada fue absorbida.

Por lo tanto, sobre la base de la biodisponibilidad oral limitada de níquel y compuestos de níquel solubles en agua, la PDE parenteral se calculó dividiendo la PDE oral por un factor de modificación de 10.

$$\text{PDE} = (220 \mu\text{g} / \text{d}) / 10 = 22 \mu\text{g} / \text{día}$$

### **PDE - Exposición por Inhalación**

Para el cálculo de la PDE por inhalación para níquel fue seleccionado de los datos disponibles.

En estudios de 2 años con óxido de níquel, no se observaron tumores en hámsteres o ratones. Hubo algunas evidencias de carcinogenicidad en ratas pero no hay evidencia de carcinogenicidad por la inhalación de níquel metálico. Para el níquel, se consideró aceptable un factor de modificación porque las formas y niveles que podrían verse en inhalación de drogas o productos no han mostrado evidencia de carcinogenicidad.

$$\text{PDE} = 6 \mu\text{g} / \text{día}$$

### **Cobalto**

Cobalto (Co) es un elemento de origen natural, a menudo combinado con otros elementos tales como oxígeno, azufre, y el arsénico. El cobalto es esencial en el cuerpo humano debido a que es un componente integral de la vitamina B12 y funciona como un co-enzima para varias enzimas críticas en la síntesis de la hemoglobina y la prevención de la anemia perniciosa. La persona promedio recibe alrededor de 11  $\mu\text{g}$  de Co / día en la dieta. La ración dietética recomendada de vitamina B12 varía desde 0,7 hasta 2,4  $\mu\text{g}$  / día, que corresponde a 0,03 a 0,1  $\mu\text{g}$  de cobalto. Se ha identificado que el cobalto inorgánico no tiene una función biológica esencial en el cuerpo humano. Los compuestos de cobalto (por ejemplo, octanoato de cobalto) se utilizan como catalizadores en la hidrogenación selectiva

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2006) llegó a la conclusión de que el sulfato de cobalto y otras sales solubles de cobalto (2<sup>+</sup>) son posibles carcinógenos humanos (Grupo 2B). Los datos indican que la ubicación de los tumores se limita a la de pulmón en ratas y seres humanos. La prueba de mutagenicidad para cobalto metálico fue positiva in vitro, pero negativos para clastogenicidad in vivo.

El NTP concluyó que fue clara la evidencia de carcinogenicidad en ratones y ratas, tanto masculinas como femeninas. Los estudios en humanos para la carcinogenicidad de inhalación no son concluyentes ni clasificados para carcinogenicidad (US EPA, 2000). La policitemia es considerada que el hallazgo más sensible después de la exposición oral repetida en los seres humanos (ATSDR, 2004).

La exposición por inhalación de los seres humanos al cobalto se ha asociado con una enfermedad respiratoria severa y progresiva conocida como la neumoconiosis de metal duro, así como el asma y la dermatitis de contacto (ATSDR, 2004; IARC, 2006).

### **PDE - Exposición oral**

La PDE oral se basa en los datos humanos disponibles. La policitemia fue un punto final sensible en los seres humanos tras la exposición repetida oral a 150 mg de cloruro de cobalto durante 22 días (~ 1 mg Co / kg / día; OMS, 2006; ATSDR, 2004). La policitemia u otros efectos no se observaron en un estudio de 10 voluntarios humanos (5 hombres y 5 mujeres) que ingirieron 1 mg / Co por día como cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) de 88 a 90 días.

La PDE por vía oral se determinó sobre la base de la NOAEL de 1 mg/día.

La PDE oral es 50 µg/día.

## **PDE - La exposición parenteral**

No se encontraron datos relevantes sobre la exposición parenteral a compuestos de cobalto. Los rangos de biodisponibilidad oral de cobalto y compuestos de cobalto inorgánicos esta entre 18 y 97% (ATSDR, 2004). Para dar cuenta de la baja la biodisponibilidad oral, la PDE parenteral se calculó dividiendo la PDE oral por un factor de modificación de 10.

La PDE para el cobalto para la exposición parenteral es: 5.0 µg / día

## **PDE - Exposición Inhalación**

Las sales de sulfato de cobalto ( $2^+$ ) y otras sales solubles son posibles carcinógenos humanos (Grupo 2B) que pueden inducir tumores pulmonares. La neumoconiosis, dermatitis de contacto y asma fueron los principales efectos no cancerígenos en los seres humanos después de la inhalación crónica. El enfoque LMR se consideró aceptable para el cobalto como los datos se consideran más fiables y la falta de datos en humanos para el sulfato de cobalto carcinogenicidad. La mejor estimación del riesgo de cáncer humano es aproximadamente la misma que la PDE derivada utilizando el LMR (OMS, 2006).

PDE = 2.9 µg/día

## **Vanadio**

El vanadio (V) está presente como un oligoelemento en la corteza terrestre y puede existir en una variedad de estados de oxidación (-1, 0, 2, 3, 4 y 5). El vanadio también está presente en cantidades traza en la mayoría de los organismos biológicos. Sus principales iones son vanadato ( $VO_3^-$ ) y vanadilo ( $VO_2^+$ )

La absorción de vanadio en el tracto gastrointestinal es pobre. Las estimaciones de la ingesta dietética total de vanadio en los humanos van desde 10 a 60 µg / día. La ingesta de agua potable depende de la fuente de agua y las estimaciones son de hasta 140 µg / día. Las poblaciones humanas tienen concentraciones séricas

variables de vanadio, siendo  $2 \mu\text{g} / \text{L}$  el extremo más alto de la gama normal. A pesar de estar omnipresente en el cuerpo, no se ha establecido una función biológica esencial para vanadio en seres humanos.

El vanadio es genotóxico, pero no mutagénico. El pentóxido de vanadio se clasifica como una posible carcinógeno humano (grupo 2B; IARC, 2012).

### **PDE - Exposición oral**

Después de la administración oral de vanadio en animales y seres humanos los objetivos principales de la toxicidad fueron el tracto gastrointestinal, cardiovascular, y sistema hematológico. El estudio más apropiado para evaluar la toxicidad vanadio a través de la administración oral se llevó a cabo en seres humanos expuestos durante 12 semanas. En este estudio, no se observó en los sujetos administrados a través de cápsula de 0,12 o 0,19 mg de vanadio como vanadil tartrato de amonio o sulfato de vanadio durante 6-12 semanas, alteraciones significativas en los parámetros hematológicos, la función del hígado (como medido por las enzimas séricas), niveles de colesterol y triglicéridos, la función renal (medida por nitrógeno ureico en sangre), el peso corporal, o la presión arterial (ATSDR, 2012). El NOAEL oral de 0.12 mg de vanadio / kg / día se utilizó para calcular la PDE oral en base a los efectos hematológicos y de presión arterial. Quedando la PDE oral =  $120 \mu\text{g} / \text{día}$

### **PDE - La exposición parenteral**

En la revisión de seguridad para el vanadio no se pudo identificar ninguna evaluación significativa sobre la cual calcular un PDE para las rutas parenterales de exposición.

Sobre la base de una biodisponibilidad oral aproximada de  $<1 - 10\%$  para los compuestos de vanadio y vanadio inorgánico (ATSDR, 2012), la PDE parenteral se calcula dividiendo el PDE por vía oral por un factor de modificación de 10.

PDE =  $12 \mu\text{g} / \text{día}$

## **PDE - Exposición Inhalación**

Se consideró un estudio de dos años en ratas con inhalación crónica de vanadio para el uso de la PDE por inhalación. En este estudio, se observaron efectos cancerígenos a la dosis más baja ensayada de 0.5 mg / m<sup>3</sup> de pentóxido de vanadio. El pentóxido de vanadio es un agente cáustico y no se considera para estar presente en los productos farmacéuticos. Por lo tanto, la PDE inhalación para el vanadio se calculó dividiendo la PDE por vía oral en un factor de modificación de 100

$$\text{PDE} = 1,2 \mu\text{g} / \text{día}$$

## **Paladio**

Paladio (Pd) es un elemento metálico de acero dúctil. Existe en tres estados de oxidación: Pd (0) (metálico), Pd (2<sup>+</sup>) y Pd (4<sup>+</sup>). El Pd puede formar compuestos organometálicos, de los cuales solo a unos pocos se le han encontrado usos industriales. El paladio (en varios soportes) está siendo utilizado como catalizador en reacciones de hidrogenación. El paladio como metal es estable en el aire y resistente al ataque de la mayoría de los reactivos excepto el agua regia y ácido nítrico.

En un estudio de 90 días en ratas macho administradas con 10, 100 y 250 ng / mL de paladio en el agua potable, se encontró que el paladio tiende a acumularse en el riñón, pero no en el hígado, pulmón, bazo o en los huesos. La eliminación era principalmente a través de la vía fecal. Varios ensayos de mutagenicidad in vitro de diferentes compuestos de paladio con células bacterianas o de mamíferos dieron resultados negativos. Los datos fueron revisados para identificar los límites de toxicidad en base a las vías de administración.

## **PDE - Exposición oral**

Se han realizado varios estudios a largo plazo en animales para explorar la toxicidad y carcinogenicidad de sales de paladio. Sin embargo, hasta la fecha,

ninguno se ha ejecutado de acuerdo con las directrices actuales para los estudios toxicológicos. Los datos disponibles sugieren un NOAEL para el paladio en el rango de 0.8-1,5 mg / kg. Un estudio de toda la vida con los ratones que recibieron cloruro de Pd ( $2^+$ ) en el agua de bebida a una dosis de aproximadamente 1.2 mg Pd / kg / día encontró una incidencia significativamente mayor de la amiloidosis en varios órganos internos de los machos y las hembras y una supresión en el crecimiento de los hombres, pero no en las mujeres.

Por lo cual, la PDE se fijo en 100  $\mu\text{g}$  / día

### **PDE - La exposición parenteral**

La revisión de seguridad para el paladio no pudo identificar ninguna evaluación significativa sobre la cual calcular un PDE para las rutas parenterales de exposición. El cloruro de  $\text{Pd}^{2+}$  ( $\text{PdCl}_2$ ) se absorbio pobremente en el tracto digestivo (<0.5% de la dosis oral inicial en ratas adultas o alrededor de 5% en ratas lactantes después de 3-4 días). La absorción / retención en ratas adultas fue mayor después de la exposición intratraqueal o intravenosa, lo que resulta en la carga corporal total de 5% o 20%, respectivamente, de la dosis administrada, 40 días después de la dosis. Sobre la base de la biodisponibilidad oral limitada de paladio, la PDE parenteral era calcula dividiendo el PDE por vía oral en un factor de modificación de 10.

PDE = 10  $\mu\text{g}$  / día

### **PDE - Exposición Inhalación**

No existen datos suficientes sobre la inhalación de Pd. Por lo tanto, la PDE inhalación se calcula dividiendo el PDE oral mediante un factor de modificación de 100.

PDE = 1,0  $\mu\text{g}$  / día

## **ANEXO F.- TÉCNICA ANALÍTICA ICP-MS** <sup>20, 21, 22, 23</sup>

La técnica analítica de ICP-MS es usada para determinaciones de trazas de metales. Fue introducida comercialmente en 1983 y ha ido ganando aceptación general en muchos tipos de laboratorios.

Entre las principales ventajas del ICP-MS se encuentran:

1. Los límites de detección pueden ser menores a una ppt (partes por trillón)
2. El rango analítico es de 9 órdenes de magnitud
3. La productividad no se supera por ninguna otra técnica
4. Se puede realizar el análisis isotópico rápidamente

### **¿Qué se puede medir con el ICP-MS?**

Se pueden medir la mayoría de los elementos de la tabla periódica. En la Figura F.1 se muestran en color los elementos que pueden ser analizados a niveles de hasta ppt, los elementos que se encuentran en color blanco no se pueden medir o no cuentan con isótopos naturales.

La mayoría de los análisis son cuantitativos, sin embargo, se puede utilizar la técnica como semi-cuantitativa.

### **Funcionamiento:**

El ICP-MS es un método que usa la inducción del plasma (ICP) como una fuente de ionización. Las muestras son introducidas dentro del plasma de argón en gotitas de aerosol, el plasma seca el aerosol y disocia las moléculas y finalmente remueve los electrones de los componentes, de este modo forma iones cargados, que son dirigidos hacia un dispositivo de filtración conocido como espectrómetro de masas, en donde son separados de acuerdo a la relación masa/carga ( $m/z$ )

La mayoría de los sistemas comerciales de ICP-MS cuentan con un cuadrupolo que rápidamente escanea en el rango de masa configurado.

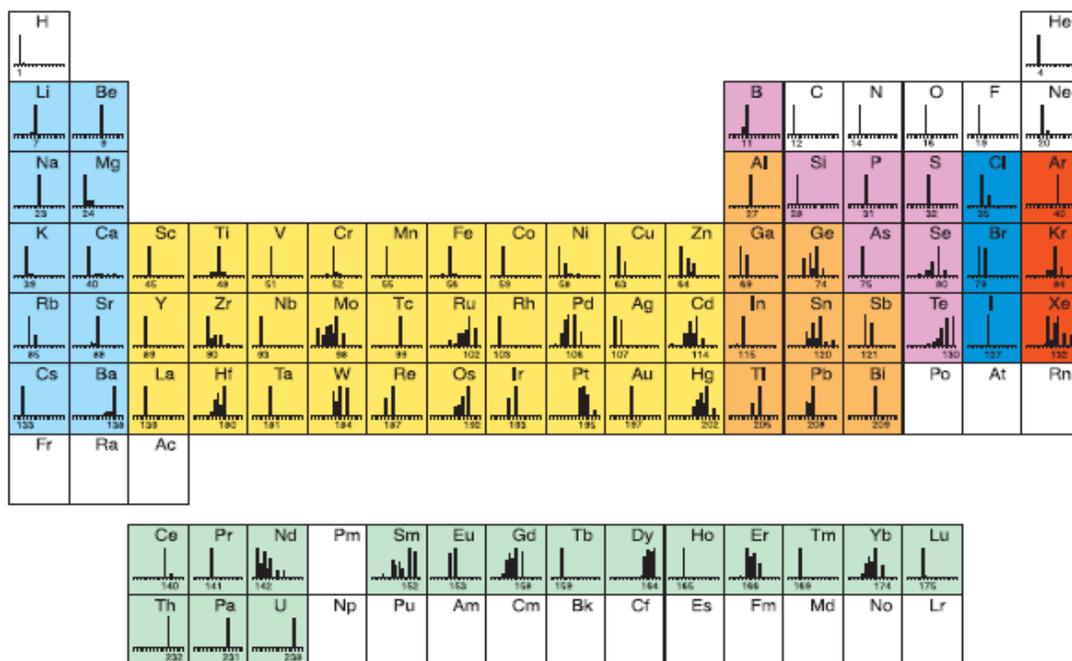


Figura F.1 Elementos analizados mediante la técnica de ICP-MS (en color)

Fuente: Notas técnicas de espectrometría ICP-MS PerkinElmer

Los iones son transportados desde el plasma a través de 2 conos (sampling cone y skimmer cone) formando la región de la interfase hacia la óptica de los iones.

La óptica de los iones consiste en unos lentes electrostáticos que toman iones de un área a presión atmosférica hacia un filtro de masa que mantiene el vacío a 10 Pa (pascal) o menos utilizando una bomba turbomolecular. Después de la filtración, los iones seleccionados por su relación masa/carga son dirigidos hacia el detector, (un canal electromultiplicador) donde los iones son convertidos en señales eléctricas. Los elementos son cuantificados de acuerdo al número de iones que llegan y generan pulsos por unidad de tiempo.

El instrumento consiste en los siguientes elementos:

1. Sistema de introducción de muestra, consiste en una bomba peristáltica que libera la solución a un flujo constante dentro del nebulizador
2. Generador de radio frecuencia (RF)
3. Antorcha de plasma
4. Región de interfase, incluyendo los conos para transportar los iones hacia la óptica de los iones

5. Espectrómetro de masas
6. Detector
7. Unidad de adquisición de datos

## **Interferencias**

La interferencia en las masas es el mayor problema, por ejemplo, las especies isobáricas se traslapan con las señales de los iones de interés, especialmente en la parte central del rango de masas de 40 a 80 uma (unidades de masa atómica), La combinación de iones atómicos forman estructuras poliatómicas (ejemplo de estos son:  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  para  $^{56}\text{Fe}$  ó  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$  con  $^{80}\text{Se}$ ) Esta matriz de interferencia puede ocurrir también con algunos analitos. Algunos muestran tienen impacto en la formación de las gotitas de aerosol o en la temperatura de ionización en el plasma. Este fenómeno puede ser debido a la supresión de señales del analito.

Las interferencias físicas pueden ser evitadas utilizando métodos internos de estandarización o por adición de un estándar. Los elementos utilizados como estándar interno dependen del elemento a ser medido, el Co y el In pueden ser utilizados como estándar interno

La principal característica del ICP-MS es la resolución, por ejemplo, la eficiencia de separación de dos masas cercanas. Los cuadrupolos son instrumentos, desde este punto de vista, inferiores a los espectrómetros del sector magnético.

## **Procedimiento**

### **Preparación e introducción de la muestra**

La preparación de la muestra por lo general incluye un paso de digestión de la matriz con un método adecuado como la digestión por microondas. Además es importante asegurar que la concentración del analito este dentro del rango de trabajo del instrumento por medio de diluciones o concentraciones previas y que la solución muestra pueda ser nebulizada de manera reproducible.

Varios sistemas de introducción de muestra toleran altas concentraciones de ácido, pero el uso de ácido sulfúrico o ácido fosfórico puede contribuir a un valor

de blanco más alto. Por esta razón, es preferible el uso de ácido nítrico y clorhídrico.

En el método para la introducción de la muestra se deben de considerar los siguientes requerimientos: sensibilidad, estabilidad, velocidad, tamaño de la muestra, resistencia a la corrosión y a los atascos. El uso de un nebulizador de flujo cruzado combinado con la cámara de nebulización y la antorcha es adecuado para estos requerimientos.

La bomba peristáltica debe de las soluciones estándar y soluciones muestra a una velocidad de 20 – 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$

### **Elección de las condiciones de operación**

Deben de ser seguidas las condiciones estándar de operación prescritas por el proveedor. Normalmente, se fijan diferentes condiciones de operación cuando son usadas soluciones acuosas o soluciones orgánicas. Los parámetros adecuados de operación deben ser elegidos adecuadamente:

1. Selección de conos
2. Velocidad de flujo de gases de acarreo
3. Potencia de la radio frecuencia
4. Velocidad de la bomba
5. Selección de uno o más de los isótopos de los elementos a ser medidos

### **Selección de los isótopos**

Para la selección de los isótopos se deben utilizar varios criterios. Se selecciona el isótopo más abundante de un elemento dado para obtener la mayor sensibilidad, sin embargo, también se debe considerar seleccionar un isótopo con menor interferencia con otras especies, con la matriz o con el gas de acarreo. La información acerca de las interferencias isobáricas o de iones poliatómicos u otros tipos como hidruros, óxidos, cloruros, etc., vienen descritas en el software del instrumen