

2 ej
36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISEÑO Y VALIDACION DE UNA AREA
CONTROLADA PARA LA ELABORACION DE
FORMAS FARMACEUTICAS ESTERILES**

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

**MARGARITA GENOVEVA FLORES HUERTA
M. JESUS FIGUEROA MALDONADO**

MEXICO, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	No. PAG.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
CAPITULO I DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN AREA ESTERIL	7
1.1 Consideraciones Fundamentales para el Diseño.	
1.1.1 Determinación del Tamaño del Area.	
1.1.2 Distribución del Area.	
1.1.3 Equipo Inmóvil.	
1.2 Características de Construcción.	
1.2.1 Area de Limpieza.	
1.2.2 Area de Preparación.	
1.2.3 Area Controlada.	
1.3 Descripción del Area Construída.	
1.3.1 Descripción de Zona Controlada.	
1.3.2 Descripción de Zona No Controlada.	
1.3.3 Sistema de Control Ambiental.	
CAPITULO II CONTROL PARA EVITAR LA CONTAMINACION	21
2.1 Métodos Físicos.	
2.1.1 Aire Filtrado.	
2.1.2 Luz Ultravioleta.	
2.1.3 Calor.	
2.1.4 Filtración de Líquidos.	
2.1.5 Destilación.	
2.2 Métodos Químicos.	
2.2.1 Desinfectantes.	
2.2.2 Oxido de Etileno.	
CAPITULO III IMPORTANCIA DEL PERSONAL	44
3.1 Características del Personal.	
3.2 Limpieza del Personal.	
3.2.1 Revisión del Estado de Salud.	
3.3 Comportamiento del Personal.	
3.3.1 Entrada al Area Controlada.	
3.3.2 Dentro del Area Controlada.	

CAPITULO IV	VALIDACION DE UN AREA CONTROLADA PARA LA ELABORACION DE PRODUCTOS ESTERILES	50
4.1	Evaluación de Filtros HEPA.	
4.1.1	Prueba de Reto con DOP.	
4.1.2	Integridad y Patrón de Flujo.	
4.1.3	Velocidad y Presión.	
4.2	Evaluación de Sanitizantes.	
4.3	Evaluación de Ciclos de Esterilización.	
4.3.1	Calor Seco y Húmedo.	
4.3.2	Oxido de Etileno.	
4.4	Validación Microbiológica del Area.	
4.4.1	Monitoreo Ambiental.	
4.4.2	Monitoreo Microbiano y Evaluación de superficies.	
4.4.3	Prueba de Simulación de Proceso.	
CAPITULO V	PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	79
5.1	Evaluación de Filtros HEPA.	
5.2	Medición de Intensidad de las Lámparas de Luz UV.	
5.3	Validación de Ciclos de Esterilización.	
5.4	Validación Microbiológica del Area.	
5.5	Prueba de Simulación de Proceso.	
	CONCLUSIONES	104
	BIBLIOGRAFIA	106

LISTA DE FIGURAS

	No. PAG.
Fig. 1.1	Flujo de materiales. 9
Fig. 1.2	Ubicación del área controlada en el área productiva. 16
Fig. 1.3	Zona controlada y no controlada. 17
Fig. 1.4	Distribución de luz UV en zona controlada. 19
Fig. 1.5	Entradas de aire filtrado a la zona controlada. 20
Fig. 2.1	Comparación de flujo laminar vs turbulento. 26
Fig. 2.2	Esquemmatización de la prueba de burbuja. 35
Fig. 5.1	Distribución de cajas petri para el muestreo del medio ambiente del área controlada para llenado de antibióticos (polvos). 88
Fig. 5.2	Distribución de cajas petri para el muestreo del medio ambiente en área controlada para preparación y llenado de líquidos. 89
Fig. 5.3	Validación microbiológica ambiental en área de antibióticos: zona crítica y blanca. 93
Fig. 5.4	Validación microbiológica ambiental en área de antibióticos: sin personal/con personal. 94
Fig. 5.5	Validación microbiológica ambiental en área de líquidos: zona crítica y blanca. 97
Fig. 5.6	Validación microbiológica ambiental en área de líquidos: sin personal/con personal. 98

LISTA DE CUADROS

No. PAG.

Cuadro 2.I	Clases de aire limpio.	24
Cuadro 2.II	Relación de porosidad y presión de las membranas filtrantes.	35
Cuadro 4.I	Bioindicadores propuestos por la USP XXI para los diferentes ciclos de esterilización.	63
Cuadro 4.II	Programa de monitoreo microbiológico ambiental.	78
Cuadro 5.I	Lecturas de intensidad de la luz UV.	81
Cuadro 5.II	Resultados de autoclave.	83
Cuadro 5.III	Resultados de horno No. 1.	85
Cuadro 5.IV	Resultados de horno No. 2.	85
Cuadro 5.V	Resultados de la evaluación microbiológica ambiental de la sección de llenado de antibióticos (polvos). Con equipo y sin personal dentro del área.	91
Cuadro 5.VI	Resultados de la evaluación microbiológica ambiental de la sección de llenado de antibióticos (polvos). Con equipo y personal dentro del área laborando normalmente.	92
Cuadro 5.VII	Resultados de la evaluación microbiológica ambiental de la sección de preparación y llenado de soluciones. Con equipo y sin personal dentro del área.	95
Cuadro 5.VIII	Resultados de la evaluación microbiológica ambiental de la sección de preparación y llenado de soluciones. Con equipo y personal dentro del área laborando normalmente.	96
Cuadro 5.IX	Resultados de la primera prueba de simulación de proceso.	100
Cuadro 5.X	Resultados de la segunda prueba de simulación proceso.	101

Cuadro 5.XI	Resumen de resultados del monitoreo microbiológico de las áreas de antibióticos (polvos) y líquidos.	101
Cuadro 5.XII	Programa de validación del área controlada.	103

INTRODUCCION

Las formas farmacéuticas parenterales son las soluciones o suspensiones estériles, empleadas para administrar fármacos por varias vías inyectables, como intravenosa, subcutánea, intramuscular, intrarraquídea, etc. Estas sustancias se presentan en el mercado en ampollitas o frascos ampula (viales).

En la preparación de productos estériles, el problema para la industria farmacéutica es obtener soluciones diáfanas, libres de partículas y/o cualquier otra materia extraña, en forma estéril y, además deben estar exentas de pirógenos.

Entre los factores que pueden interferir en la obtención de productos estériles con las características antes mencionadas se encuentran los siguientes:

- Envases y tapones.- Es una parte muy importante en la producción de formas farmacéuticas estériles ya que estos de no ser tratados adecuadamente podrían contribuir en gran medida a la contaminación física, química o biológica de los medicamentos. Para prevenir la contaminación bacteriana que proviene de envases y tapones se llevan a cabo diferentes métodos de esterilización como pueden ser por calor seco, húmedo y/u óxido de etileno dependiendo del material de que se trate.
- Aire.- Es una de las mayores fuentes contaminantes de partículas y microorganismos; para combatir éste problema, un buen sistema farmacéutico exige cierto equipo básico, que nos ayude a mantener un ambiente limpio existiendo varios métodos para limpiarlo y esterilizarlo como son: filtración (HEPA), luz UV, y otros. Esto proporciona las condiciones adecuadas para manejar las soluciones que no han de esterilizarse en su envase definitivo y la experiencia ha demostrado que los cuartos de llenado deben ser contruidos de acuerdo a un diseño apropiado.
- Personal.- Las formas farmacéuticas estériles deben prepararse siguiendo las normas de producción con el mayor cuidado por un personal bien instruido y experto. Se debe concientizar al personal de que es una fuente de contaminación de partículas físicas y biológicas por lo que debe de cumplir con ciertas características de limpieza y comportamiento dentro del área de trabajo, así como también la importancia de vestir adecuadamente para entrar al área estéril.
- Locales de Trabajo.- Las áreas de trabajo controladas deben ser contruidas con un diseño básico que cumpla con

los requisitos exigidos por los Organismos Gubernamentales autorizados, de tal manera que cubran las necesidades requeridas en las buenas prácticas de manufactura. Estos locales además deben proporcionar un confort adecuado para el personal que en ellos laboran, por lo tanto se debe tener un control de humedad y temperatura, además es necesario llevarlo para la estabilidad del producto. La sanitización es otro de los factores que se debe considerar para lograr la esterilidad de los lugares de trabajo.

La prevención de la contaminación debe ser el principal objetivo en el diseño y construcción de las llamadas áreas controladas para la obtención de productos estériles, por lo tanto, uno de los objetivos perseguidos en este trabajo es diseñar un área controlada para elaborar productos estériles considerando las necesidades de un laboratorio farmacéutico así como también el comprobar que el acabado final cumple con las especificaciones exigidas por las buenas prácticas de manufactura.

El diseño y construcción de un área controlada es un tema bastante amplio y de mucho interés e importancia, sólo que en éste trabajo no se profundizará y únicamente se mencionarán en forma superficial los puntos de mayor interés para el Químico Farmacéutico Biólogo como lo es el acabado final del área.

Otro de los objetivos de éste trabajo es el de realizar un programa de validación del área diseñado para verificar su funcionalidad. El proceso de validación viene cobrando cada vez más importancia en los conceptos de diseño y construcción de plantas farmacéuticas. En años recientes la industria farmacéutica y la Secretaría de salud han puesto mayor interés en el campo de control de calidad sobre todo en el proceso de validación.

La validación es un programa destinado a establecer evidencias documentadas que permitan asegurar con alto grado de confianza y tomando en cuenta el estado de los conocimientos y el arte farmacéutico que a través de un proceso específico se obtiene o se obtendrá un producto que reúna todas las especificaciones y atributos de calidad preestablecidos.

Lo sofisticado del diseño de un área controlada siempre será orientado a las necesidades de la empresa siempre que cumpla con los requisitos necesarios exigidos por las dependencias gubernamentales relacionadas con la industria farmacéutica y si además se puede decir que se trabaja en un ambiente validado se cumplirá con una alta calidad en los productos estériles que ahí se elaboran.

GENERALIDADES

Cualquier impureza, ya sea que esté constituida por seres vivos u objetos inanimados, es considerada como un contaminante. Dentro de estos contaminantes se definen tres diferentes tipos (1):

- Contaminantes microbiológicos.
- Contaminantes físicos.
- Contaminantes químicos.

Contaminantes Microbiológicos.- Los microbios habitan en cualquier parte: la tierra, el aire, el cuerpo humano y por lo general resultan peligrosos si aumentan demasiado en su cantidad o si son introducidos en cualquier parte de nuestro cuerpo, pudiendo originar enfermedades como pulmonía, tuberculosis, las infecciones intestinales; por ello no debe haber contaminantes de éste tipo en los productos estériles.

Contaminantes Físicos.- El aire contiene partículas de diferente tamaño, la mayoría de esas partículas son tan pequeñas que es imposible observarlas a simple vista y las mayores tienen un tamaño menor al diámetro de un cabello (150 micras). Si son introducidas al cuerpo humano causan daños como embolismo, oclusión o granulomas (2).

Contaminantes Químicos.- Son las sustancias extrañas a la formulación de un producto y es conocida como contaminación cruzada.

Area estéril se puede definir como un volumen en el cual no existe ningún microorganismo vivo, ni en su forma vegetativa ni en su forma esporulada. Considerando ésta definición podemos decir que no existe área estéril absoluta, ya que los métodos de esterilización de aire empleados en la elaboración de formas farmacéuticas estériles nos ofrecen una eficiencia máxima de 99.97%, como se mencionará durante el desarrollo de éste trabajo. Por lo tanto al hablar de área estéril nos estamos refiriendo a un Area Controlada para obtener productos estériles.

Los cuartos estériles generalmente son requeridos para proteger un producto de la contaminación que radica en el ambiente de trabajo y en el personal que ahí labora.

El aire es una de las fuentes mayores de contaminantes de partículas y microorganismos. Los contaminantes básicamente se hallan representados por cenizas, restos vegetales, polen, fibras diversas, desprendimientos tegumentarios humanos y de animales, partículas minerales y orgánicas, tierra, etc (3) (4).

En la actualidad se cuenta con sistemas muy perfeccionados que brindan un aire limpio. Sin embargo, esto no garantiza que el aire limpio que ha ingresado en un área de trabajo se mantenga mucho tiempo como tal, pues rápidamente se contamina con las partículas del medio circundante, provistas hasta por el mismo operario.

Cuando gran parte de las partículas se han eliminado se dan condiciones de "SALA LIMPIA" o "AMBIENTE LIMPIO", esto es cuando pueden ser debidamente controlados el número de partículas, de gérmenes, humedad y temperatura. Esto trae como consecuencia una clasificación de "AMBIENTES LIMPIOS" definidos por su contenido de partículas de acuerdo a los estatutos de la Norma Federal Standard 209 de los Estados Unidos de Norteamérica que constituye una guía para tipificarlos (4) (5).

POR QUE NECESITAMOS CUARTOS LIMPIOS.

Se consideran 3 razones por las cuales debemos prevernos de cuartos limpios en la elaboración de productos estériles y son las siguientes (6):

- 1.- Mantenimiento de esterilidad para llenados asépticos.
- 2.- Prevención de la pirogenocidad de productos estériles terminados.
- 3.- Prevención de la contaminación de los productos por partículas.

1.- Mantenimiento de Esterilidad para Llenados Asépticos.

El llenado aséptico es probablemente la operación más crítica de todas, primero debe reconocerse que la esterilidad no es una cantidad medible. Un simple vial es estéril o no lo es. Para un llenado aséptico, no se pueden tener bastantes muestras para tener un alto nivel de confianza, así que se trabaja a la categoría de 'CERO DEFECTOS' por lo que se debe proveer, cuantificar y validar todos los sistemas que operan para producir un producto de calidad estéril.

La calidad del aire como una de las respuestas del filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) debe ser clase 100 continuamente. El aire provee un efecto purgante en donde existe la posibilidad de la existencia de productos o componentes contaminados, luego el más grande peligro para la esterilidad son probablemente los operadores. Cada esfuerzo debe hacerse para minimizar el contacto del operador, o la cercanía de él a los viales. Cuando esto no es posible, puede hacerse necesario la acción de aire purgante de cubiertas de flujo laminar para evitar turbulencias.

2.- Prevención de la Pirogenocidad de Productos Estériles Terminados.

No solo los microbios vivos son peligrosos al encontrarse en un área o producto estéril. Sino que también lo son los microbios muertos o bien los desechos de los microbios. Estos contaminantes se llaman 'PIROGENOS' y se caracterizan por que al inyectarse al cuerpo causan elevación de la temperatura, escalofríos, dolores de espalda, de piernas, malestar general, y hasta la muerte.

A diferencia de la esterilidad, la pirogenocidad es una cantidad medible y la prueba es descrita por la USP como sigue: (la prueba es realizada en tres conejos) si ninguno de los tres conejos muestra una elevación individual de temperatura de 0.6 grados centígrados o más sobre su respectiva "temperatura de control o inicial" y si la suma de los tres aumentos máximos de temperatura no excede de 1.4 grados, el producto satisface las especificaciones de la prueba de ausencia de pirógenos. La prueba con el Lisado de *Limulus Polyphemus*, también impone ciertos límites (7).

Si las materias primas, los viales y los tapones están libres de pirógenos es imposible que un producto se contamine por pirógenos provenientes del aire contaminado ya que la calidad de contaminación no puede ser lo suficientemente grande para crear un producto que quede fuera de especificaciones de la prueba de pirógenos después de ser esterilizado. Esto sería particularmente si al final del llenado el producto es esterilizado, pero en el caso en que no ocurre así, se debe asegurar de que se esté trabajando en un ambiente de aire de clase 100.

3.- Prevención de la Contaminación de los Productos por Partículas.

Los productos estériles así como el área de llenado no solo deben estar exentos de microbios y pirógenos sino también de polvo, pelusas, trocitos de vidrio, metal, plástico, hule, cabellos o cualquier otro objeto o sustancia semejante, ya sea que tengan un llenado aséptico o que sean esterilizados al final del llenado pues representan un riesgo para el paciente.

Imagine usted una persona enferma de los ojos que necesita utilizar unas gotas en cuyo interior hay pequeñas partículas de vidrio, o bien un individuo a quien debe inyectarse el contenido de una ampollita que contiene pequeños pedacitos de metal.

Las partículas están presentes en todas partes y se pueden presentar en infinidad de formas y tamaños; pueden estar en el aire, en el techo, el piso, los muebles, la ropa, etc. Así que para prevenir éste tipo de contaminación se debe contar con un ambiente de trabajo adecuado.

CAPITULO I DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN AREA CONTROLADA

1.1. CONSIDERACIONES FUNDAMENTALES PARA EL DISEÑO DE UN AREA CONTROLADA.

Para diseñar un área controlada es necesario hacer un minucioso estudio sobre los factores que influyen directamente en la calidad del ambiente de trabajo, entre estos factores se pueden mencionar los siguientes (7) (9):

- 1.- Determinación del tamaño del área.
- 2.- Distribución del área (diagrama de flujo).
- 3.- Equipo inmóvil.

1.1.1 DETERMINACION DEL TAMAÑO DEL AREA.

La planta debe estar diseñada y construida de tal manera que pueda permanecer siempre limpia. Un área controlada debe estar diseñada de tal forma que se aisle del medio ambiente exterior y de tamaño suficiente que baste para satisfacer la producción, siempre y cuando no sea menor de 10 metros cuadrados, contará además con cubículos adyacentes para que el personal se vista con ropa estéril (10) (11).

El tamaño de un área es específica para cada necesidad y dependerá de los siguientes factores.

- a) Línea de Productos.- Una empresa puede producir toda la gama de productos estériles: soluciones, oftálmicos, inyectables, productos liofilizados, polvos, etc., o producir solo algunos de ellos.
- b) Volumen de Producción.- Es un factor determinante para el cálculo del tamaño del área. A mayor diversidad de formas farmacéuticas por producir será mayor el número de cuartos necesarios y posiblemente mayor la cantidad de personal, y solamente que se cuente con equipo modernizado el personal se puede reducir.

1.1.2 DISTRIBUCION DEL AREA.

El diseño de un área para productos estériles será de tal manera que permita la entrada y salida del personal y materiales sin peligro de contaminación. El área de producción de formas farmacéuticas estériles normalmente debe ser dividida en 5 áreas seccionales (12):

- Area de limpieza.
- Area de preparación.
- Area controlada o de llenado.
- Area de cuarentena.
- Area de empaque.

Todas estas áreas deben ser diseñadas y construidas para obtener facilidad de limpieza, operación eficiente y bienestar del personal. El diseño y control de un área controlada debe ser planeado de tal forma que quede adyacente a las otras, con la finalidad de mantener las condiciones de aséptica en toda el área de producción.

Esto normalmente involucra divisiones selladas, generalmente paneles de vidrio para mayor visibilidad y claridad. La entrada al área controlada deberá ser solamente a través de puertas de seguridad entre el área controlada y el cuarto de vestido, por lo tanto, se diseñará de tal manera que ambas puertas no puedan ser abiertas a la vez.

En general los componentes de un producto preparado en área controlada deben fluir de la bodega a:

- Area de preparación (todos los ingredientes de la fórmula).
- Area de limpieza (los contenedores, ampollitas, frascos y tapones).

Todo el equipo y suplemento de llenado debe ser estéril viniendo directamente del proceso de esterilización, preferentemente a través de autoclaves de doble puerta. Cuando esto no sea posible se debe hacer por medio de paquetes con envoltura doble y serán pasados a través de puertas de mínimo tamaño que puedan ser cerradas rápidamente bajo condiciones asépticas.

La envoltura exterior de los paquetes debe ser desatada y el contenido con la envoltura interior es recibido por el personal que está dentro del área controlada para llenado y sellado.

Todos los componentes deben fluir con seguridad al área controlada para el llenado del producto en su envase apropiado. Estos movimientos deben efectuarse de acuerdo a los reglamentos de las Buenas Prácticas de Manufactura en áreas estériles respecto a la introducción de materiales y equipo al área con carácter estéril.

Del área de llenado el producto debe pasar al área de cuarentena donde debe ser retenido hasta que se realicen todas las pruebas necesarias. Si el producto debe ser esterilizado en su envase final, el flujo normal debe ser interrumpido después que el producto sale del área aséptica de llenado para ejecutar el proceso de esterilización. Después de conocer el resultado de las pruebas se establece la efectividad y seguridad del producto, se pasa al área final para su marcado y empaque. Algunas veces se pueden presentar algunas variaciones en éste diagrama de flujo con la finalidad de obtener las necesidades específicas de un producto individual o para facilitar su aprovechamiento (ver fig. 1.1).

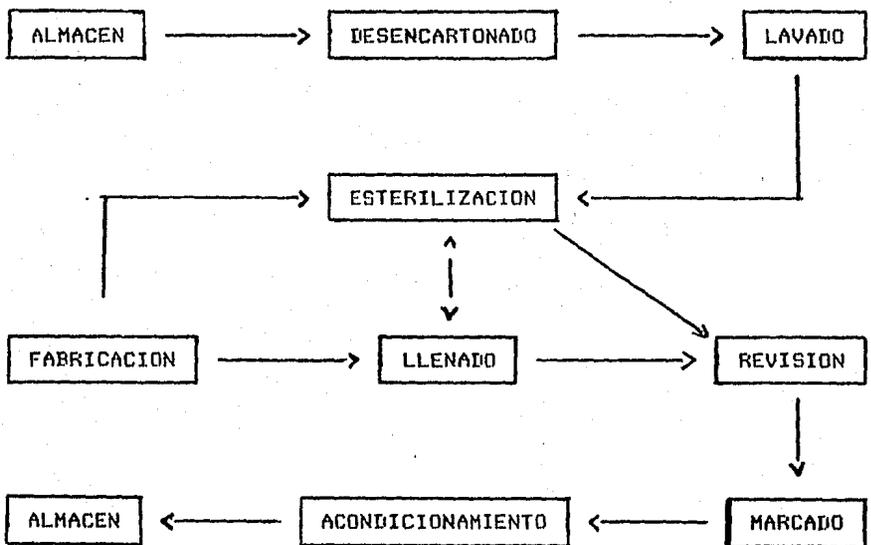


Fig. 1.1 Flujo de materiales.

1.1.3 EQUIPO INMOVIL.

Dentro de un área controlada debe existir la mínima cantidad de equipo, por ejemplo: máquinas llenadoras, dosificadoras, liofilizadores, gabinetes, mesas, etc. Este equipo permanece dentro del área de trabajo cubiertas todas sus partes mecánicas y solo ocasionalmente llega a sacarse para recibir una limpieza especial; para llevar a cabo la limpieza de éste equipo se debe contar con manuales por escrito que describan éste tratamiento sin romper la esterilidad del área.

Dentro del equipo inmóvil es importante mencionar:

- Equipo de fabricación.
- Hornos y autoclave esterilizadores de doble puerta.
- Lavadoras de frascos, ampolletas y tapones.
- Engargoladoras.
- Dosificadoras de polvos.
- Llenadoras y selladoras de ampolletas.
- Llenadoras para frasco ampula (líquidos y polvos).

Es importante señalar la colocación de los hornos y autoclaves, deben ser de tamaño adecuado dependiendo del volumen de producción e independientemente de esto ambos deben ser de doble puerta, comunicando la zona de llenado con la zona de lavado.

1.2 CARACTERISTICAS DE CONSTRUCCION DE UN AREA CONTROLADA

Anteriormente los cuartos de un área controlada eran contruidos usando material de contrucción tradicional como: ladrillos, tablas, yeso y pintura común; pero debido a que con éste tipo de construcción nunca se lograron las condiciones ambientales requeridas de un área controlada éste acto fué puesto en manos expertas de ingenieros, arquitectos y diseñadores, asesorados por técnicos de la industria farmacéutica que basan su criterio en las buenas parácticas de manufactura y en la actualidad podemos lograr las condiciones deseadas en dichas construcciones (13) (14).

Hay un número de materiales alternativos que pueden ser usados en la construcción de cuartos controlados, tales como laminas de acero inoxidable, tablaroca, laminación de aluminio, plástico, plástico laminado, fibra de vidrio y formaica.

Los materiales más comunmente empleados son las láminas de acero inoxidable y aluminio, aunque las más indicadas son los plásticos, plásticos laminados y fibra de vidrio así como la tablaroca, ya que las superficies de metal son muy vulnerables a la corrosión y oxidación de tal forma que podrían ser dañadas debido a que los cuartos deben fumigarse periódicamente, por ejemplo con formaldehído que es un fumigante popular de gran efectividad, sin embargo produce alta humedad durante la gasificación (11) (13) (15).

Las superficies deben cubrirse con pintura epóxica y para cubrir el piso se utilizan baldosas, resinas e incluso laminaciones vinílicas que a veces se hacen polimerizar en el mismo lugar.

Al hablar de construcción es muy importante tomar las consideraciones necesarias en cuanto a la integridad y elasticidad de los materiales empleados en el sellado de juntas de paneles, la estabilidad de adhesivos usados, así como también los materiales de paredes y techos deben ser compatibles con los del piso. El material empleado debe ser ampliamente estable a los ciclos de temperatura y humedad.

La presurización es una de las funciones más importantes a considerar en el diseño de un área controlada, se recomiendan monitoreos y alarmas de presión en áreas estériles y mantenimiento de una presión de 0.05 pulg. de agua, entre dos áreas limpias adyacentes. Habrá también puertas de entrada y salida interpuestas, dado que el área nunca deberá estar directamente expuesta al ambiente circundante.

Lo ideal es un inyector de abastecimiento y un retorno de aire. Si se quiere un deshumificador se debe poner mucha atención en la selección de una unidad segura, que no vaya a ser causa de desbalances. La hermeticidad del suministro y del ducto de retorno es de lo más importante; se recomienda añadir o utilizar un ducto de alta presión de construcción estándar y que tenga los orificios de prueba estrictamente necesarios.

A continuación se darán las características de construcción de cada una de las áreas involucradas en la preparación de productos estériles. Estas áreas deben estar adecuadamente

equipadas para que la temperatura, humedad, iluminación y ventilación sean combinadas para el confort del personal que allí labore.

1.2.1 AREA DE LIMPIEZA.

El área de limpieza debe estar construida para soportar, humedad, vapores y detergentes. Los techos paredes y pisos deben ser contruidos de material impermeabilizante de tal manera que la humedad corra y no la retenga.

Debe haber precauciones para prevenir la acumulación de suciedad y el desarrollo de microorganismos especialmente por la presencia de alta humedad y calor. Esta área no necesita ser aséptica pero si limpiable y permanecer siempre limpia y se deben tener ciertas precauciones para prevenir la contaminación en el área controlada.

1.2.2 AREA DE PREPARACION.

En ésta área todos los componentes de la formulación son mezclados, así que aquí las condiciones de limpieza del equipo toma un papel muy importante, no es esencial que ésta área sea aséptica, sin embargo se le considera como tal, por lo tanto, los controles de limpieza deben ser más estrictos que en el área de limpieza.

Los gabinetes y mesas preferentemente deben ser de acero inoxidable, los muebles deben ser pegados a la pared, los techos, paredes y pisos deben ser lisos. Es conveniente dar un acabado con una capa de pintura epóxica o de vinil para obtener una superficie continua libre de agujeros y grietas. Todas las superficies deben lavarse a intervalos regulares para mantener una limpieza completa.

1.2.3 AREA CONTROLADA.

Esta requiere una construcción especial diseñada para obtener máxima seguridad, las características se pueden enumerar de la manera siguiente:

- 1.- La superficie interna de las paredes, techos y pisos debe ser:
 - Lisa.
 - Impermeable.
 - No desprender o acumular materia particulada.
 - Permitir repetidas aplicaciones de agentes de limpieza y desinfectantes.
 - Debe ser libre de grietas y agujeros.
 - Evitar formación de escalones.
- 2.- Para reducir la acumulación del polvo y facilitar la limpieza deben ser:
 - Exenta de bordes y salientes.
 - Los ángulos que forman las paredes y éstas con el techo y el piso deben ser redondeados.
- 3.- Falsos techos (si los hay) deben ser adecuadamente sellados para prevenir la contaminación del espacio sobre ellos.
- 4.- El recubrimiento de pintura epóxica de piso a pared deberá ser continuo, si se emplean láminas de materiales de construcción, las juntas deben ser selladas y emparejadas para evitar trampas de polvo.
- 5.- Las ventanas no tendrán posibilidades de abrirse y el vidrio se ajustará con cordones de goma. Los vidrios así como el marco para su aplicación serán de ángulos redondeados y las juntas lisas, de tal modo que no ofrezcan rincones donde puedan albergarse partículas. Las ventanas internas y externas serán dobles para evitar escalones.
- 6.- Las conexiones eléctricas de iluminación y conexiones eléctricas para luz ultravioleta permanentes deben estar

empotradas en las paredes o convenientemente ocultas y los sistemas de encendido deben tener un sistema automático que permita ponerlas en servicio cuando se apaga la luz y viceversa.

- 7.- Las conexiones de gas, aire comprimido, vacío, etc., también deben permanecer ocultas, en el interior solo debe haber las llaves de salida tipo hospital.
- 8.- Toda la tubería y cables permanentes deben ser acanalados y ocultos.
- 9.- La tubería deberá ser fabricada de materiales resistentes a la corrosión y de propiedades no frágiles.
- 10.- Las instalaciones eléctricas deben ser antideflagrante e impermeables para su adecuada limpieza.
- 11.- Los artefactos deben colocarse al nivel del techo o de la pared.
- 12.- Las lámparas de luz ultravioleta deben proveer un sistema automático que permita ponerlas en servicio cuando se apaga la luz de iluminación normal.
- 13.- Las mesas bancos y asientos deben ser de un material que no libere partículas, como de acero inoxidable o plástico y su contacto con el piso debe ser mínimo para facilitar su limpieza.
- 14.- Las instalaciones en general deben presentar facilidad para desmontarse y reinstalarse en un futuro próximo.
- 15.- El sistema de construcción debe cumplir con estatutos de construcción códigos y regulaciones relacionados con la elaboración de productos farmacéuticos estériles.
- 16.- El sistema de construcción debe ser una inversión económica.
- 17.- El buen manejo es muy importante ya que se indican estándares de alta precisión que son de consideración especial.

Si en la construcción de un área controlada son considerados todos estos puntos, puede asegurarse que como resultado se obtendrán un producto de calidad estéril. No obstante, la experiencia ha reportado algunas variantes, pero apegándose a las normas exigidas por los organismos gubernamentales de la industria farmacéutica obteniéndose resultados satisfactorios.

1.3 DESCRIPCION DEL AREA CONSTRUIDA

El área consta de una superficie de 13 x 20 mts. (360 mts. cuadrados), la cual fué subdividida en dos zonas (fig. 1.3): zona controlada y zona no controlada.

Las características de construcción cumplen con las especificaciones del punto 1.2.3; su construcción es a base de tablaroca.

1.3.1 DESCRIPCION DE LA ZONA CONTROLADA.

La zona controlada (estéril) es dividida en dos secciones:

- Sección de llenado de antibióticos (povos).
- Sección de preparación y llenado de soluciones inyectables.

La Sección de Llenado de Antibióticos.- consta de:

- Cuarto de desvestido (zona negra).
- Cuarto de vestido (zonas gris y blanca).
- Cuarto de esterilización y enfriamiento.
- Sección de llenado.
- Esclusa.

Todas éstas con control de luz UV y aire filtrado, a excepción del cuarto de desvestido que no tiene luz ultravioleta. El cuarto de vestido consta además de su lavamanos con jabonera (zona gris), una banca que divide la zona gris de la zona blanca y un espejo en la zona blanca que sirve para verificar el buen vestido.

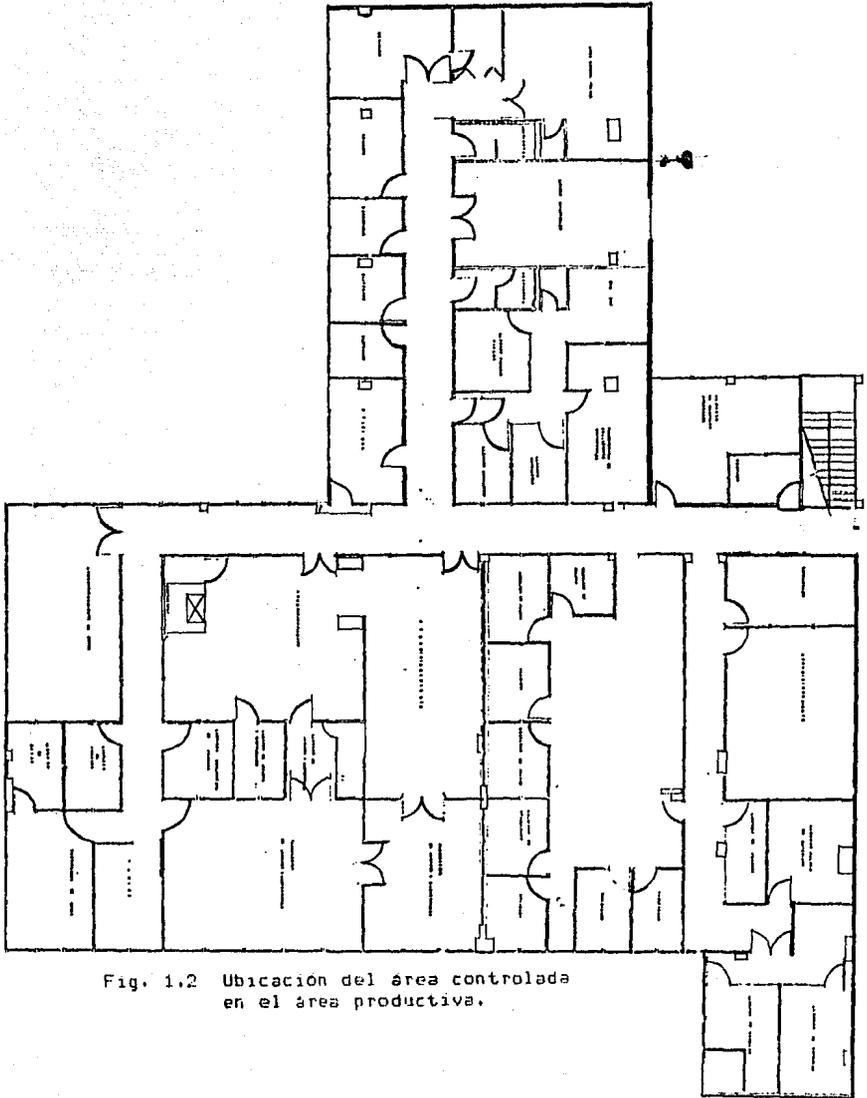


Fig. 1.2 Ubicación del área controlada en el área productiva.

ZONA CONTROLADA

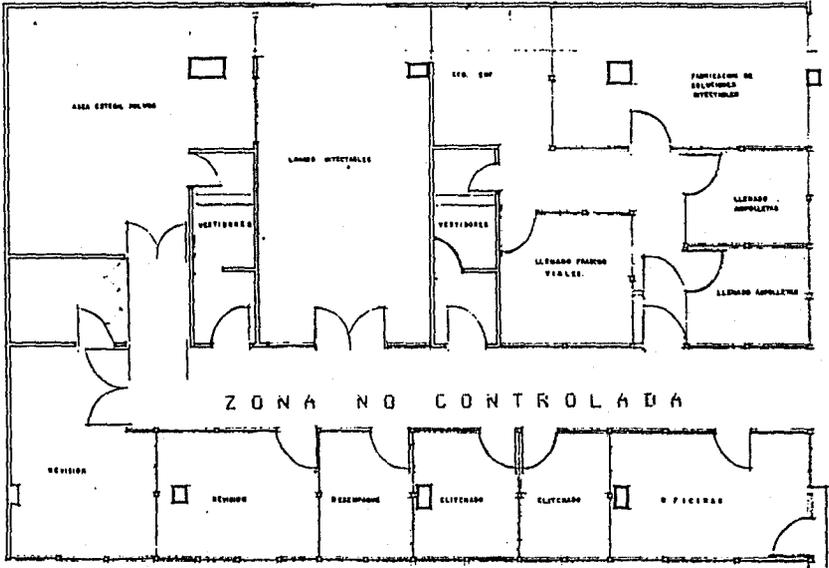


Fig. 1.3 Zona controlada y zona no controlada.

La esclusa situada dentro de la zona blanca es el lugar por donde entran y salen los materiales y en donde se colocarán los materiales durante un determinado tiempo en exposición de luz UV además presentará presión positiva para evitar la entrada de contaminantes al área.

La Sección de Fabricación y Llenado de Soluciones.- Consta de:

- Cuarto de desvestido.
- Cuarto de vestido.
- Cuarto de esterilización y enfriamiento.
- Sección de preparación de soluciones inyectables.
- Dos secciones de llenado de ampollitas.
- Sección de llenado de frasco vial.
- Exclusa.

Las condiciones en esta zona son similares a las ya descritas para la zona de llenado de antibióticos.

1.3.2 DESCRIPCIÓN DE LA ZONA NO CONTROLADA.

En la zona no controlada (no estéril) se encuentran incluidas las secciones necesarias para llevar a cabo los procesos auxiliares de la fabricación, desde la entrada de los materiales hasta la entrega del producto terminado a acondicionamiento sin incluir el proceso de llenado. Estas secciones son las siguientes:

- Sección de desencartonado.- En esta zona se reciben los materiales en su empaque original y es donde se despojan de las cajas de cartón pasándose a charolas de acero inoxidable.
- Sección de lavado.- Esta sección une a las dos zonas controladas y consta de máquinas lavadoras, estufa y autoclave de doble puerta.
- Sección de revisión.- Aquí se lleva a cabo la revisión del producto terminado para determinar partículas en suspensión, anomalías en el sellado, defecto de frasco, etc.
- Sección de marcado.- Es el último paso del producto donde es marcado y enviado a acondicionamiento.

1.3.3 SISTEMA DE CONTROL AMBIENTAL.

El área controlada tiene sistema de luz UV con lámparas de cátodo caliente empotradas en la parte del techo en un número suficiente que permite tener un ambiente controlado, se encuentran lámparas de luz UV en cuarto de vestido, cuarto de enfriamiento, zona de llenado y en esclusa (fig. 1.4).

Consta de flujo de aire acondicionado y filtrado a través de filtros absolutos, teniendo una rejilla de entrada de aire colocada en la parte superior del área de tal manera que la dirección sea hacia las rejillas de salida colocadas en la parte inferior opuesta a la rejilla de entrada, evitando que se formen turbulencias; en la zona de líquidos están con dirección hacia el pasillo que une cada una de las secciones, permitiendo la salida del aire a través de las puertas obteniéndose una presión positiva constante, se presenta una rejilla de entrada en cada una de las secciones de esta zona. En la zona de llenado de antibióticos se tiene el mismo sistema de entrada y salida de aire (fig. 1.5).

Ambas secciones constan de un manómetro que mide la presión del aire, registrandola en pulgadas de agua, también están equipadas con un higrómetro y un termómetro.

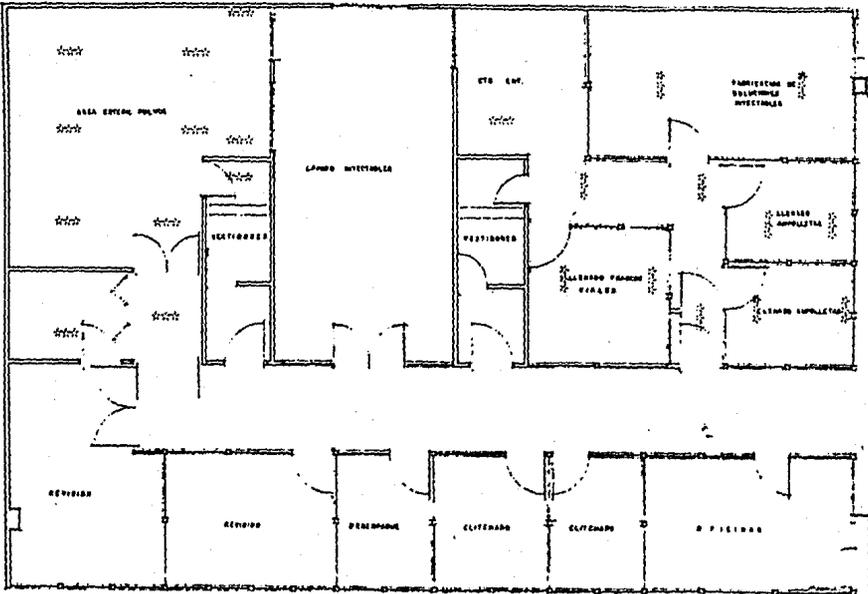


Fig. 1.4 Distribución de luz UV (***) en zona controlada.

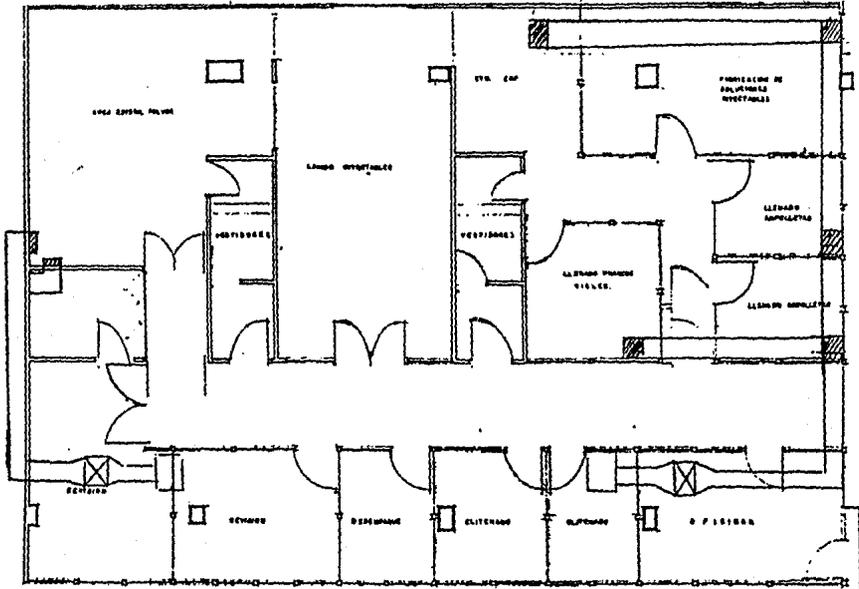


Fig. 1.5  Entradas de aire filtrado a la zona controlada.

CAPITULO II CONTROL PARA EVITAR LA CONTAMINACION

Con el fin de mantener estéril un producto a lo largo de su fabricación es necesario efectuar una serie de procedimientos destinados a impedir la contaminación de las herramientas, materiales y utensilios empleados durante su procedimiento. Estos procedimientos se conocen en conjunto como técnicas de sanitización.

En la actualidad se emplean dos métodos que ayudan a la prevención de la contaminación .

- Métodos físicos.
- Métodos químicos

2.1 METODOS FISICOS.

Los métodos físicos empleados correctamente resultan ser muy efectivos para la eliminación de microbios, pirógenos y algunos ayudan a disminuir la cantidad de partículas en el ambiente.

Los métodos físicos más comunmente empleados son:

- 2.1.1 Aire filtrado
- 2.1.2 Luz ultravioleta
- 2.1.3 Calor
- 2.1.4 Filtración de líquidos (micro y ultrafiltración)
- 2.1.5 Destilación

2.1.1 AIRE FILTRADO.

En las salas asepticas destinadas al llenado de soluciones estériles, debe haber ventilación con aire adecuadamente filtrado, debe mantenerse en todo tiempo una presión positiva del aire, de manera que cuando se abran las puertas no penetre aire sin filtrar. El aire debe filtrarse para quitarle el polvo y las partículas cargadas de bacterias.

El aire puede esterilizarse por filtración, éste método ha adquirido una seguridad y comodidad de manejo y al incluir instalaciones de luz ultravioleta en los ductos se obtiene mayor confiabilidad en su esterilización.

El control de la contaminación de un ambiente comienza con medidas destinadas a evitar el ingreso de envases, cartonería o recipientes portadores de partículas.

Para obtener la limpieza del aire se han estudiado varios medios de recirculación de aire o de filtración lográndose en el mejor de los casos la eliminación de las partículas.

Para obtener una uniformidad en la distribución del área y para mantener y reducir la contaminación es de fundamental importancia estudiar el flujo de aire en el ambiente acondicionado, teniéndose dos diferentes categorías de flujo del aire.

- Flujo convencional o turbulento.
- Flujo laminar

Flujo Convencional.

La velocidad del aire de una área controlada con un sistema de flujo convencional es de cerca de 0.25 m/seg, una velocidad inferior no permite el intercambio de partículas mientras que una velocidad mayor causaría excesiva turbulencia.

El número de cambios de aire será de 12 a 30 veces/hora, proporcionando una concentración de 1 750 000 - 3 500 000 partículas/m³ utilizando el limpiador de acondicionamiento de filtros de alta eficiencia.

Flujo Laminar.

La obtención de un aire prácticamente estéril se debe al empleo de filtros absolutos conocidos como HEPA (High Efficiency Particulate Air) desarrollado por la Comisión Nacional de Energía Atómica de los Estados Unidos en la década de 1940 (19).

Los filtros absolutos son los filtros finales de un sistema que comienza por los prefiltros, que eliminan el 98% de las partículas de 5 micras o mayores y cumplen el doble propósito de proteger los filtros finales por retención de las partículas y crean una caída de presión que ayuda a la distribución uniforme del aire (4).

Las partículas del ambiente suelen ser de diferente tamaño, las mayores por efecto de la gravedad caen, y lo hacen con movimientos más o menos complicados, pero cuando su tamaño se haya por debajo de 0.5 micras las partículas se agitan por un movimiento Browniano que las mantienen en suspensión en la atmósfera. Como consecuencia siempre existirán zonas de turbulencia en donde también las partículas depositadas serán atraídas hacia ellas, formandose verdaderas bolsas de polución. En tales condiciones no puede ejercerse auténtico control de partículas, ya que no se puede preveer su distribución en la sala.

La norma Federal Standard 209 (5) dá una clasificación de cuartos limpios que depende del contenido de partículas del aire.

SALA DE CLASE 100. Contiene 100 partículas o menos de un tamaño igual o mayor de 0.5 micras por pie cúbico de aire (3.5 - 4.0 partículas por litro) y no contiene partículas iguales o mayores de 5 micras. Esta es la calidad del aire que resulta por tratamiento con el sistema de flujo laminar y es el que se persigue al diseñar una área estéril (se estudiará posteriormente en éste capítulo) (20) (21).

SALA DE CLASE 1 000. Contiene 1 000 partículas o menos de un tamaño igual o mayor de 0.5 micras por pie cúbico de aire (35 - 40 partículas por litro) y un máximo de 10 de 5 micras en igual volumen.

SALA DE CLASE 10 000. Así se denomina a la sala o ambiente cuya cuenta no excede de 10 000 partículas por pie cúbico de aire (350 - 400 partículas por litro) de 0.5 micras y mayores de las que solo 65 por pie cúbico (2.3 partículas por litro) podrán ser de 5 micras o más.

SALA DE CLASE 100 000. En éste caso la cuenta no excede de 100 000 partículas por pie cúbico de aire (3 500 - 4 000 partículas por litro) de 5 micras y mayores. Así se define la sala simplemente "LIMPIA".

Las condiciones de humedad y temperatura son las mismas para las diferentes clases de ambiente (4) (5):

a) Humedad Relativa.- Un promedio del 45% con tolerancia de más menos 10% para el caso general y de más menos 5% para las elaboraciones sensibles a la humedad del ambiente.

b) Temperatura.- 19 a 25 grados centígrados con variaciones de más menos 2.5 grados centígrados para los casos corrientes y no más de 0.25 grados centígrados para las operaciones sensibles a la temperatura.

Para poder alcanzar los niveles de limpieza de la clase 100, se pensó en la necesidad de acondicionar el aire no solo en cuanto a temperatura, humedad y limpieza sino también a la dirección de su corriente, y de ésta manera surgió la idea de que todo el techo se construyera de filtros HEPA y se lanzara un gran volumen de aire con velocidad de flujo uniforme en sentido vertical y que además ese flujo fuera recibido por debajo de un piso enrejado para que se lograra el efecto de flujo laminar.

Cuadro 2.1 Clases de Aire Limpio.

Clase	Máximo número de partículas de tamaño igual o mayor de 0.5 micras	Máximo número de partículas de tamaño igual o mayor de 5.0 micras
100	100 (3.5) *	----- *
10 000	10 000 (350) *	65 (2.3) *
100 000	100 000 (3 500) *	700 (25) *

* Partículas/litro (sistema métrico)

La Federal Standard 209 define el flujo laminar como "Flujo de aire por el cual la totalidad del aire de un recinto se desplaza a una velocidad uniforme a lo largo de líneas paralelas de flujo con el mínimo de turbulencias" (5).

Esta norma establece para éste flujo vertical la velocidad de 90 ft/min (27 mts/min) como la necesidad para la eliminación

de las partículas del aire sin afectar el confort del operador. El proceso es continuo y por lo tanto el operador no se enfrenta dos veces con el mismo aire. Cualquier partícula que él mismo libere en cuestión de segundos y a una velocidad próxima de los 2 Km/hr se elimina de la zona de trabajo.

Con los sistemas de aire acondicionado el aire se cambia alrededor de 12 veces por hora, mientras que con el flujo laminar alcanza a cambiar 10 veces más obteniéndose un aire 500 veces más limpio.

Algunas de las ventajas del sistema de flujo laminar son las siguientes:

- 1.- Provee un aire ultralimpio, no turbulento.
- 2.- El sistema permite la autolimpieza del aire.
- 3.- Elimina la contaminación cruzada.
- 4.- Dentro de ciertos límites permite alguna liberalidad respecto de las rígidas normas que se imponen al operador en las zonas estériles.

Principio del sistema de Filtración y Flujo Laminar.- La instalación se divide en dos partes (4):

- Un sistema que se haya constituido de inyección de aire destinado a mantener un flujo constante.
- Un sistema que permite una mezcla de aire fresco con aire primario en movimiento, a fin de alcanzar los niveles deseados de temperatura y humedad.

Por regla general, es necesario que la velocidad del flujo de aire que se adopte sea proporcional a la actividad que se desarrolle en la sala.

En la sala se puede instalar 3 tipos de flujo:

- En vertical en donde el aire se desplaza del techo al piso.
- El horizontal en donde el aire va de una pared a la opuesta.
- El mixto en donde el aire va de una pared al piso o del techo a la pared justo por arriba del nivel del suelo.

Es interesante la comparación de una área controlada con flujo tradicional contra un laminar. En un día de labores las partículas ascienden a cerca de 35 000 000/m³ en un flujo tradicional con turbulencia y a 35 000/m³ con flujo laminar (16).

COMPARACION FLUJO LAMINAR VS TURBULENTO

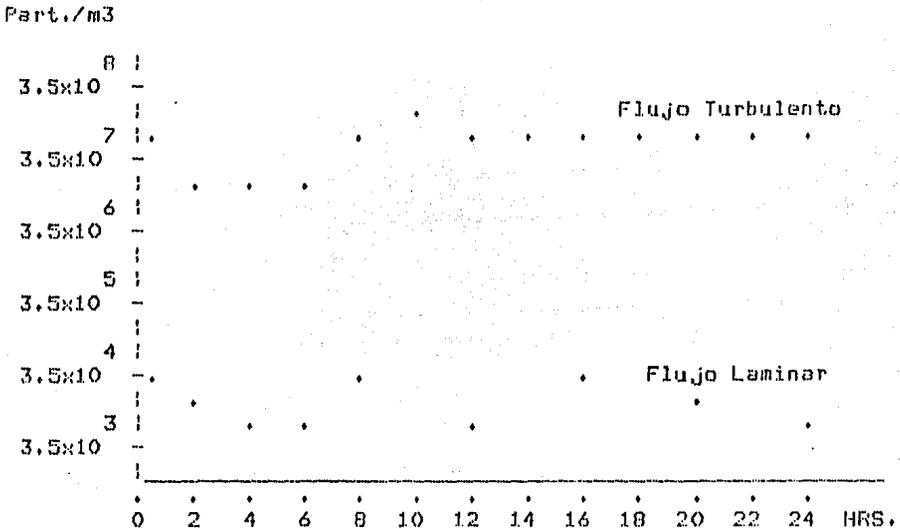


Fig. 2.1 Comparación de flujo laminar vs turbulento.

Precipitador Eléctrico.

La esterilización del aire por éste método se efectúa de la siguiente manera: el aire a tratar, pasa a través de una serie de rejillas cargadas de potenciales eléctricos. Las partículas se cargan positiva o negativamente y son atraídas por los elementos del filtro de carga contraria los cuales están cubiertos con adhesivos, lo que hace que las partículas queden atrapadas. Los filtros se lavan periódicamente (9).

Un circuito convierte 115 volts de corriente alterna a la tensión continua de alto voltaje necesario para la operación del precipitador eléctrico. El transformador eleva primero el voltaje de la línea a 3 000 volts, éste alto voltaje es rectificado por el tubo de vacío y este es convertido en corriente continua siendo aplicado a las rejillas.

2.1.2 LUZ ULTRAVIOLETA.

Los rayos de luz ultravioleta tienen una acción antibacteriana, produciendo una acción desinfectante en una superficie directamente irradiada. Estos rayos penetran la mayoría de los materiales produciendo algunos efectos en la superficie, con la principal excepción de la penetración limitada a través del aire y agua pura (22).

Los rayos de luz ultravioleta viajan solo en línea recta, son irritantes a la piel y particularmente a los ojos humanos. Por eso el personal en estas áreas debe tener protección al exponerse directamente a la irradiación.

Las lámparas de luz ultravioleta son instaladas para proveer una radiación directa y otras indirecta. La irradiación directa en un cuarto de personal, no se presenta un medio valuable para reducir la cuenta bacteriana en superficie de trabajo y pisos. La irradiación local tiene que ser usada en instalación de tipo capucha sobre el llenado y otras operaciones del proceso para protección contra la contaminación, las lámparas de luz ultravioleta usualmente están empleadas en conjunto con flujo laminar, da una irradiación adecuada letal para microorganismos que estén portados en la corriente de aire.

Para poder matar con irradiación las bacterias necesitan estar por tiempo suficiente con una intensidad efectiva, es necesario saber que las bacterias tienen una disminución en el crecimiento por la exposición a la irradiación letal, debido a que estas radiaciones ocasionan reacciones químicas en los componentes vitales de la célula, particularmente a nivel de ácidos nucleicos de tal acción resulta la muerte de la célula (23) (24).

La luz ultravioleta está constituida por fotones de baja energía intrínseca. El máximo efecto de la luz ultravioleta está entre 240 - 280 nm. A 280 nm tiene un fuerte poder bactericida que resulta ser peligroso para el personal que labora sin protección en las áreas irradiadas, provocando eritemas y conjuntivitis (4).

La mayor acción germicida se obtiene a 265 nm. La radiación empleada en la práctica es la que corresponde a 253.7 nm y es producida por la lámpara de mercurio y corresponde al 75% de la óptima. Hay que tener en cuenta que la relación entre intensidad de radiación y tiempo de exposición del material es constante (10).

Lo práctico de los rayos de luz U.V. son las lámparas de vapor con cátodo caliente de mercurio. Las lámparas usan un tubo de vidrio de tal manera que los rayos pasen hacia afuera, el vidrio regularmente cambia en su estructura de cristal con el uso ocasionando que el paso de los rayos sean reducidos gradualmente. Es requerida una irradiación de intensidad de 20 microwatts/cm² para lograr actividad antibacteriana efectiva.

Evaluación de intensidad y acción antibacteriana de la luz UV.

La luz UV es medida por horas de vida, el cambio de la luz UV debe hacerse cuando tenga de 30-35% menos de la lectura inicial, asegurándose de que la limpieza del tubo sea correcta y no sea ésta la causa de la disminución de potencia de la luz UV.

Un método para evaluar la luz UV, es exponiendo una suspensión de células bacterianas a las radiaciones ultravioleta por un tiempo determinado. Una parte de la suspensión se siembra en placas inmediatamente después de la exposición y se incuba en la obscuridad para determinar el número de "supervivientes" (25).

Mecanismo de muerte por luz ultravioleta.

El mecanismo fundamental a nivel molecular de la muerte por U.V. es probablemente la lesión irreversible del DNA que es de dos tipos: mutaciones letales y modificaciones químicas que interfieren la subsiguiente replicación del DNA (por ejemplo uniones cruzadas entre las bases). El número de supervivientes observados al estudiar una suspensión celular irradiada, así como el número de mutantes aparecidos, está en relación con la rapidez en la reanudación del crecimiento (22) (24).

2.1.3 CALOR.

Calor Húmedo.

Esta técnica es la más usada, para esterilizar todos los materiales a excepción de aquellos a los que podría alterar. Es rápida, todos los organismos son susceptibles y el agente penetra entre los recodos alcanzando lugares que podrían permanecer inatacados por los desinfectantes químicos. Los hongos, la mayor parte de los virus y las células vegetativas de varias bacterias patógenas se esterilizan de 50 - 70 grados centígrados en pocos minutos (4) (23) (26).

Puesto que para los medios de cultivo es esencial la esterilización lo mismo que para algunos instrumentos usados en la técnica de llenado se ha usado un autoclave con vapor a la temperatura de 121 grados centígrados durante 15 a 20 minutos, temperatura que alcanza el vapor a una presión de 15 lb (1 atm) por pulgada cuadrada sobre la presión atmosférica en puntos situados aproximadamente al nivel del mar (27) (28) (29).

Al usar el autoclave es importante que la corriente de vapor desplace el aire antes de que aumente la presión. Cuando el vapor se halla mezclado con el aire, la temperatura viene determinada por la presión parcial del vapor de agua, de aquí que el vapor saturado (libre de aire) a 15 lb (1 atm) de presión manométrica tenga una temperatura de 121 grados centígrados. De hecho, el efecto del aire es siempre nocivo puesto que siempre tenderá a permanecer no calentado en el fondo de la cámara.

Es también importante que los recipientes tengan un cierre adecuado y no estén completamente llenos de líquido, a fin de permitir la libre ebullición del líquido durante el calentamiento y la libre ebullición del líquido sobrecalentado cuando descienda la presión de vapor.

Con objetos voluminosos o con grandes volúmenes de líquidos es necesario una mayor permanencia a fin de permitir que el calor alcance la totalidad del material.

La sensibilidad de un organismo al calor se expresa con frecuencia en la práctica por el punto térmico mortal, que es la temperatura más baja, a la cual una exposición durante 10 minutos, de un determinado volumen de caldo de cultivo o de una suspensión turbia de células conduce a su esterilización. Se ha encontrado que esta temperatura son 120 grados centígrados para las esporas más resistentes.

Este criterio cualitativo ha sido sustituido por una determinación cuantitativa del número de supervivientes en diferentes tiempos y puesto que la muerte por el calor posee una cinética exponencial simple, el grado de muerte puede expresarse en términos de la constante K (dependiente de la temperatura):

$$\ln N/N_0 = -kt$$

El mecanismo de esterilización por calor implica, evidentemente, una desnaturalización proteica. De aquí que el grado de temperatura necesario sea aquel en que se desnaturaliza la mayor parte de proteínas; además, tanto la esterilización como la desnaturalización proteica tienen un coeficiente térmico elevado.

Ciclo de esterilización.

Comprende el tiempo necesario para desarrollar todas las operaciones que corresponden a un proceso de esterilización completo.

Es necesario tener en cuenta que el tiempo de esterilización se toma desde el momento en que el material ha alcanzado la temperatura de esterilización. Este periodo se debe determinar en forma experimental para cada caso (está vinculado con su naturaleza y volumen) siendo mayor para los materiales envasados en recipientes cerrados herméticamente.

El autoclave debe ser sometido a pruebas de presión hidrostática con un exceso no inferior al 50% de la presión de trabajo, no se deben observar pérdidas de líquido en ninguna de las conexiones ni deformaciones ni en la cubierta ni en el fondo. Se debe controlar también hermeticidad en pruebas de vacío, la seguridad de la válvulas y el tiempo de conservación del vacío en la autoclave cerrada, puede aprovecharse para determinar la posibilidad de fugas de vapor. El control de la distribución homogénea del calor es importante sobre todo en las autoclaves grandes lo que puede hacerse colocando termopares o termómetros de máxima convenientemente distribuidos en los puntos dudosos (3) (4).

Leyes generales de la destrucción de los microorganismos por el calor.

- Primera ley.- Para una temperatura dada, el número de gérmenes o esporas sobrevivientes al tratamiento térmico, decrece en forma exponencial en función del tiempo de aplicación del tratamiento (30).

Este decrecimiento representa la destrucción de microorganismos y la curva responde a la siguiente ecuación:

$$N = N_0 e^{-kt}$$

Donde t es el tiempo de tratamiento a una temperatura dada, siendo N_0 el número inicial de microorganismos, cuando el número de sobrevivientes tiene un valor que equivale al 10% del inicial. Comúnmente a ese tiempo se le denomina D y su valor depende del tipo de microorganismo del medio en que se encuentre y de la temperatura del tratamiento.

- Segunda ley.- Para una misma reducción de una población microbiana dada, la duración del tratamiento térmico decrece de forma exponencial en función de la elevación de la temperatura. Esta ley es definida por el parámetro z , que es la elevación de temperatura que reduce la duración del tratamiento a un décimo de su valor.

Dichos fundamentos han dado lugar a un método alternativo para validar la efectividad del proceso de autoclaveado tomando como bases las formas microbianas más resistentes a la acción térmica (*Bacillus stercorarius* para calor húmedo). Podemos admitir que al ser eliminados éstos microorganismos los menos resistentes habrán sido por lo tanto también eliminados.

Se deben tener datos confiables y altamente precisos para identificar dos variables más:

- a) El efecto térmico real del proceso de esterilización en puntos representativos dentro de la cámara del autoclave.
- b) Datos acerca de la penetración del calor al producto en cada tipo y tamaño de envase al ser esterilizado, usando termopar el cual es sensible y repetitivo a cambios de temperatura tan pequeños como 0.1 grados o menos, la pequeña fuerza electromotriz producida en la junta bimetálica del termopar es amplificada electrónicamente por instrumentos fuera de la cámara. El termopar entonces es conectado de tal manera que la temperatura puede ser medida y registrada.

Calor Seco.

Según se sabe, cuando las bacterias y los virus se encuentran secos, necesitan, al igual que las enzimas aisladas, una temperatura más elevada para que se produzca una lesión irreversible. La esterilización segura mediante calor seco, requiere de temperaturas elevadas superiores a 160 grados centígrados durante dos horas. El calor seco tiene el inconveniente de que el aire caliente penetra en los materiales porosos con mucha más lentitud que el vapor; así, después de una hora a 160 grados el interior de un gran paquete de compresas quirúrgicas puede no alcanzar aún los 100 grados centígrados. La esterilización por el calor seco se usa, en general sólo para objetos metálicos y de vidrio (4).

Se puede aplicar por acción directa de la llama con la finalidad de esterilizar instrumentos de uso accidental y se aplicará de modo que la llama toque toda la superficie del objeto y que su masa llegue a la temperatura del rojo sombra.

Con más frecuencia se aplica el calor seco calentando el aire en el interior de una estufa diseñada especialmente para ese fin. El diseño debe asegurar una distribución homogénea de la temperatura. Para cumplir con ese requisito indispensable es muy importante tener en cuenta la naturaleza de la fuente del calor y su ubicación con respecto a la estructura metálica de la estufa.

Naturalmente que se debe determinar el tiempo de esterilización a partir del momento en que la cámara y el material alcanzan la temperatura seleccionada, en éste sentido, las farmacopeas difieren tanto en la medida de la temperatura como en el tiempo necesario, algunas exigen una temperatura de 160 - 170 grados centígrados durante una hora; la USP indica dos horas a 170 grados centígrados. Es conveniente cargar el material cuando la estufa esté a la temperatura ambiente porque su naturaleza, tamaño y cantidad tienen también influencia sobre éste periodo de calentamiento.

La única ventaja que podemos señalar se refiere a los casos en que sean necesario tener el producto estéril completamente seco, como cuando se trata de material de vidrio.

La construcción de la estufa es relativamente simple, ya que consta de una caja, por lo general de cobre con una puerta frontal y estantería metálica con ingreso del aire caliente o los gases de combustión en la parte inferior con una salida regulable colocada en la parte superior. La calefacción es regulable con un termostato que la controle.

Entre los dispositivos más importantes, consideramos de interés los siguientes:

- La pared metálica puede ser doble creando una cámara de aire entre ellas.
- La cámara puede estar rellena con material aislante o mejor dicho la pared externa está recubierta por un material aislante.
- El sistema de calefacción puede estar colocado en la parte lateral, entre las dos paredes, con una separación que facilite y oriente la convección del aire caliente.
- Un circulador de aire colocado debajo de la columna de calefacción, que provoque una convección forzada, aumenta la homogeneidad y la velocidad del calentamiento.

2.1.4 FILTRACION DE LIQUIDOS.

La filtración es una técnica de esterilización que el farmacéutico practica desde los tiempos más remotos, en forma artesanal. La evolución de su conocimiento desde el punto de vista técnico, ha permitido integrar los factores que la componen con el carácter de operación unitaria y lograr normas correctas para resolver los más diversos problemas de filtración, ensayo de materiales filtrantes, selección de filtros, empleo y valoración de los auxiliares de filtración, etc. (3).

La aplicación de la filtración a la esterilización de fluidos es una de las consecuencias de esos estudios, cuya aplicación con este fin permite la separación física de los microorganismos del medio líquido o gas que los contiene por un dispositivo poroso que los retiene por acción mecánica basada en el tamaño de los poros y por adsorción.

La aplicación de la esterilización por filtración se puede dividir en dos grupos:

- Esterilización de líquidos, agua, agua destilada y soluciones para uso inyectable.
- Esterilización de gases, en particular de aire y su extensión a la esterilización de ambientes (visto en el capítulo 2.1.1).

Esterilización de Líquidos.

Los filtros que se emplean para este fin responden a diversas formas y composición química y deben reunir las siguientes condiciones (4),

- No alterar la composición ni los caracteres organolépticos del líquido que pasa por él. No ceder materiales solubles al líquido.
- Tener una porosidad uniforme en toda su superficie, sin determinar mucha pérdida en el flujo del líquido.
- Retener los gérmenes con seguridad.
- Soportar las diferencias de presión necesarias para obtener un caudal eficaz y no sufrir alteraciones estructurales por acción de las soluciones.
- Ser fácil de limpiar o de preferencia desechables.

- Soportar la esterilización por el vapor a 121 grados centígrados.
- Económico, no sólo en su costo directo, sino también en las maniobras de preparación y empleo.

Debe considerarse que la filtración farmacéutica corriente es de elevada eficacia y que por lo común retiene todas las partículas de más de 5 micras. El paso hacia una retención de partículas del tamaño correspondiente a los microorganismos se dio al principio con materiales cerámicos como porcelanas no vitrificadas, vidrio poroso y placas de asbesto. La aparición más reciente de las placas y sobre todo de las membranas desechables para filtración, las ha transformado en el elemento de acción en la esterilización de soluciones parenterales.

La resistencia al paso del líquido, que determina una pérdida de carga en la solución a filtrar puede vencerse por el empleo de bombas impulsoras del líquido, por presión ejercida sobre el recipiente donde se ha preparado la solución o por vacío. Indudablemente la resistencia es mayor a medida que se emplean membranas de poros más finos. Casi siempre se usan membranas con poros de 0.22 o 0.45 micras, pero los fabricantes proveen materiales que pueden variar su porosidad entre 12 micras y 5 milimicras. Pueden emplearse las de mayor tamaño como prefiltros, dejando para las de cerca de 0.22 micras la esterilización propiamente dicha, evitando que obstruyan sus poros con rapidez.

Prueba de Integridad de Membrana.

En el método de esterilización por filtración debe verificarse la integridad de sus filtros mediante la prueba de la burbuja. Esta prueba se realiza para comprobar la integridad de la membrana y así tener seguridad del producto esterilizado por filtración (31) (32).

Toda membrana tiene una presión preestablecida mínima que resiste el paso del aire a través de ella, al aplicar presiones superiores a la mínima preestablecida hay apertura de los poros y permite el paso del aire, que es detectado en un recipiente con agua donde se presenta un burbujeo continuo (fig. 2.2).

Se recomienda que ésta prueba se haga al inicio y al final del proceso de filtración.

Se humedece la membrana ya sea con agua o con el líquido filtrante y se aplica presión hasta que haya burbujeo en el recipiente con agua y se lee la presión a la que se presentó burbujeo, ésta no debe ser menor a la preestablecida. Cada membrana tiene su valor particular y varía con la marca.

Cuadro 2.II Relación de Porosidad y Presión de las Membranas Filtrantes.

Porosidad	Presión
0.22 micras	55 lbs.
0.45 micras	33 lbs.
1.20 micras	12 lbs.

En la práctica de esterilización por filtración de soluciones, la aplicación más común es la destinada a la preparación de inyectables en solución acuosa, fraccionada en ampolleta.

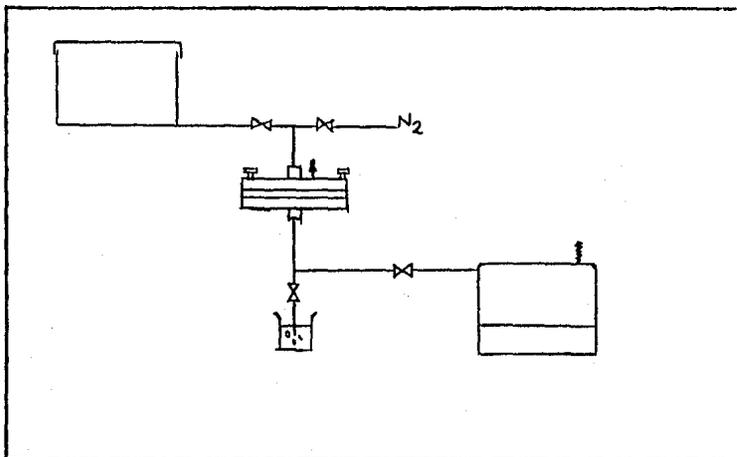


Fig. 2.2 Esquematización de la prueba de burbuja.

2.1.5 DESTILACION.

Al hervir el agua se vaporiza dejando como residuos las impurezas; al condensar estos vapores, se obtiene agua limpia, exenta de los contaminantes que contenía al principio.

El agua es el vehículo que normalmente se usa para la preparación de soluciones estériles, por lo que debe cumplir con los requisitos indicados en la USP para la prueba de pirógenos. El agua para inyección libre de pirógenos se prepara por destilación, es preferible que el agua destilada se use inmediatamente después de preparada, por lo regular en las primeras 24 horas de destilada.

El agua debe destilarse adecuadamente, recogerse cuidadosamente, protegerse de toda contaminación y conservarse libre de pirógenos por un tiempo mucho mayor que el límite (24 horas después de destilada), por el contrario puede ocurrir que se contamine en las 2 primeras horas y se vuelva completamente pirogénica en condiciones inapropiadas.

Está permitido almacenar agua recientemente destilada para usarla en el futuro en soluciones parenterales, esto se logra envasandola en recipientes apropiados inmediatamente después de destilada y esterilizandola rapidamente. El agua almacenada debe cumplir en todo tiempo las pruebas de esterilidad de la USP.

La especificación importante final es que debe demostrarse que el agua para inyecciones y el agua estéril estén libres de pirógenos.

La composición de los pirógenos es de fosfolípidos y polisacáridos que enmascaran una proteína. Son los microbios muertos o bien los desechos de los microbios, éstos provocan una reacción similar a una severa reacción alérgica en la producción de fiebre, una migración de linfocitos, completa actividad y liberación de histaminas, la sobre-reacción como mecanismo de defensa puede provocar la muerte o debilitar todo el sistema circulatorio (33).

Los pirógenos se presentan probablemente con mayor frecuencia en el disolvente empleado para preparar la inyección, debemos recordar que cuando se multiplican las bacterias pueden producir pirógenos. Son muchas las precauciones que se deben seguir en su almacenamiento para evitar la contaminación con pirógenos. Es necesario mantener una temperatura superior o inferior a la apropiada para el desarrollo bacteriano.

El equipo puede ser fuente de contaminación, por lo que se debe hacer una limpieza apropiada con abundante jabón, detergente, ácido o álcalis, evitándose la proliferación de bacterias en el equipo. Es esencial escurrir bien todo el equipo después de lavarlo cuidadosamente, se debe dedicar igual cuidado al proceso de fabricación. Conviene por lo tanto preparar únicamente el material que se usará en un día de trabajo, ya que la rapidez desfavorece al crecimiento microbiano. El almacenaje a temperaturas adecuadas o en presencia de conservadores evitará el desarrollo de las bacterias, pero carece de seguridad de un proceso que se lleva al término sin interrupciones.

Los pirógenos son destruidos por ácidos, álcalis y calentamiento entre 200 - 250 grados centígrados durante 30 minutos; pero estos métodos no pueden aplicarse a las soluciones, ya que los pirógenos atraviesan los filtros que detienen a las bacterias. En la actualidad se está usando el método de ultrafiltración para eliminar los pirógenos, que es una filtración fraccionada que elimina los solutos más finos incluyendo pirógenos.

2.2 METODOS QUIMICOS.

Existen muchos agentes químicos que son eficaces para destruir los microorganismos, especialmente las bacterias. Hay miles de sustancias químicas y de preparaciones que afectan la vitalidad de los microorganismos; entre los principales agentes antimicrobianos están los desinfectantes y el óxido de etileno.

2.2.1 DESINFECTANTES.

Los desinfectantes son letales para todo tipo de células. Debido a ésta inespecificidad, no es sorprendente que las bacterias desarrollan muy poca resistencia a éstos agentes. No obstante es muy arbitrario clasificar una sustancia como desinfectante, puesto que una gran cantidad de compuestos ejercen una acción inhibitoria del crecimiento bacteriano cuando se hallan en una concentración suficiente (34).

El hecho de que una sustancia sea nutritiva o tóxica para las bacterias depende con frecuencia de su concentración. En oposición a lo que sucede con la mayor parte de agentes quimioterápicos bactericidas, los desinfectantes actúan directamente sobre las estructuras celulares.

Pueden distinguirse dos mecanismos principales:

- Disolución de los lípidos de la membrana celular (mediante detergentes disolventes de lípidos).
- Alteraciones irreversibles de las proteínas (por ejemplo, oxidantes, agentes alquilantes y reactivos sulfhídricos).

El grado de muerte por medio de los desinfectantes aumenta con la concentración del compuesto y con la temperatura, al igual que sucede con las reacciones químicas. Los agentes antibacterianos capaces de ionizarse como ácidos son más activos cuando se incrementa la acidez de la solución, entre tanto que lo opuesto es válido para los reactivos catiónicos.

Con el fin de emplear correctamente los desinfectantes es necesario considerar que:

- a) Uno de los factores esenciales para la efectividad de un desinfectante, es su concentración, generalmente existe una concentración adecuada para cada desinfectante.
- b) Como método de defensa, los microbios crean resistencia contra los desinfectantes y es por ello que éstos deben usarse en forma alternada.

Entre los desinfectantes más comunmente empleados en la industria farmacéutica están los siguientes:

Fenol y Compuestos Fenólicos.— El fenol fué usado desde hace muchos años en las técnicas de asepsia y aunque es todavía un desinfectante de uso común, hoy se cuenta con otros mucho más eficaces y activos a concentraciones notablemente menores. Se sigue empleando también el fenol como compuesto tipo o patrón con el que se comparan los demás desinfectantes para estimar su actividad bactericida. Este ensayo se conoce con la denominación de método del coeficiente de Fenol (25).

Coeficiente del fenol.— El coeficiente fenólico de un compuesto es la proporción existente entre las concentraciones esterilizantes mínimas del fenol y la concentración necesaria de un compuesto determinado, para lograr el mismo efecto. Para ello se procede diluyendo un caldo de cultivo 1:10 con varias concentraciones de éste compuesto en diferentes tubos, el tubo límite es aquel de menor concentración en el que se produce una total esterilización de la muestra después de una incubación de 10 min., a 20 grados centígrados; se recomienda la utilización de germicida a concentraciones 5 veces superiores a la existente en el tubo límite de la prueba. Para ésta prueba se utilizan en

general dos organismos, *S. typhosa* como representante del grupo entérico y *Staphylococcus aureus* como el principal causante de las infecciones en las heridas.

El coeficiente fénolico proporciona un índice útil para comparar distintos desinfectantes. De aquí que las concentraciones de un desinfectante, C , necesarias para esterilizar una población bacteriana en distintos tiempos t , corresponde generalmente a una curva, en la cual puede ajustarse mediante la ecuación:

$$C^n t = K$$

La efectividad de una técnica desinfectante depende con frecuencia de la limpieza del material, la eficacia de un desinfectante debe valorarse en las condiciones en que se usa.

Alcoholes.- El alcohol etílico se emplea con mucha frecuencia como desinfectante de la piel, para el uso general las concentraciones entre 50-70% son las más eficaces. Se afirma que la concentración del 70% es la más eficaz como bactericida (25) (35).

El alcohol metílico es menos bactericida que el etílico; además es muy tóxico. Los alcoholes superiores, propílico, butílico, amílico y otros son más germicidas que el etílico. En realidad, hay un incremento progresivo del poder germicida a medida que aumenta el peso molecular de éstos alcoholes.

Los alcoholes coagulan las proteínas y este efecto explica su actividad germicida, son también deshidratantes. Parte de la eficacia del alcohol como desinfectante de superficies puede atribuirse a su acción limpiadora o detergente.

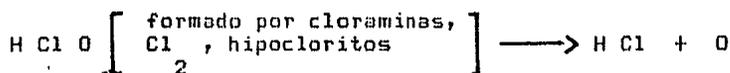
Iodo.- El iodo es un agente bactericida muy activo y tiene la singular propiedad de ser poco selectivo en su acción, mostrándose eficaz contra toda clase bacterias, tiene también efecto esporicida; sin embargo la intensidad con que son destruidas las esporas depende notablemente de las condiciones de exposición; por ejemplo, cantidad de materia orgánica presente y grado de desintegración. Además es un poderoso fungicida y en cierta medida antivirulento. Los vapores de iodo son empleados para la desinfección de aire.

El fundamento de la acción antimicrobiana del iodo no es bien conocido, se supone que el iodo se combina con alguna proteína (quizá alguna enzima) con la consiguiente alteración de una substancia esencial para la vida de las células.

Cloro y Compuestos Clorados.- Existen muchos compuestos de cloro que pueden emplearse con más facilidad que el cloro libre por ejemplo hipocloritos y cloraminas. La acción germicida del cloro y sus derivados se realiza por medio del ácido hipocloroso, que se forma en combinación del cloro elemental con el agua, según la siguiente reacción.



Del mismo modo, los hipocloritos y las cloraminas forman ácido hipocloroso después de hidrolizarse. El HClO que se produce en cada caso se descompone ulteriormente como se indica a continuación:



El oxígeno desprendido en la reacción anterior (oxígeno naciente) es un poderoso agente oxidante, cuyo efecto sobre los constituyentes de la célula destruye los microorganismos. La acción letal del cloro y sus derivados se debe también, en parte, a la combinación directa de aquel elemento con alguna substancia celular y la consiguiente intoxicación de la célula.

Metales Pesados y sus Derivados.- La mayor parte de los metales pesados, sea como elemento o en ciertas combinaciones químicas, ejercen efecto nocivo sobre los microorganismos. Los más activos en éste aspecto son el Hg, Ag y Cu. La acción antimicrobiana de los metales y de sus compuestos se debe a la combinación del ión metálico con ciertas proteínas de la célula, inactivándolas.

Jabones y Detergentes Sintéticos.- Los jabones son sales de sodio y potasio de los ácidos grasos superiores, como grupo son ligeramente germicidas y presentan acción selectiva contra los microorganismos. Disuelven los lípidos y desnaturalizan las proteínas en las soluciones.

Compuestos de Amonio Cuaternario.- La mayor parte de los detergentes catiónicos germicidas son sales de amonio cuaternario. El poder bactericida de las sales de amonio es excepcionalmente elevado contra las bacterias Gram (+), pero son también muy activos contra los organismos Gram (-). Las concentraciones bactericidas oscilan entre diluciones de una parte en algunos miles a una parte en varios cientos de miles. Las sales de amonio cuaternario son también fungicidas y poseen acción nociva para ciertos protozoarios patógenos. El modo de acción de los detergentes catiónicos desinfectantes no se conoce

exactamente, es posible que inactiven ciertas enzimas de los microorganismos debido a su propiedad de combinarse con las proteínas y desnaturalizarlas; otra posibilidad es que alteren la superficie de la célula, dando lugar a la filtración de los constituyentes celulares al exterior.

Aplicación de Agentes Sanitizantes.

Las actividades de desinfección y limpieza se llevarán de acuerdo al programa establecido (indicando fecha y nombre del desinfectante) con el objeto de evitar la formación de microorganismos resistentes. Durante la limpieza del área estéril deberá usarse el uniforme estéril reglamentario (1).

Todos los días se limpian paredes, techos, mesas, útiles de trabajo y suelo con soluciones germicidas mismas que se usarán de acuerdo al programa establecido.

Cada semana fumigar cuartos, techos, paredes, pisos, ventanas y equipo con soluciones germicidas de acuerdo al programa de desinfección.

Las normas mencionadas anteriormente se efectuarán por lavado, aspirado o cualquier otro método adecuado de limpieza. Nunca deberá usarse el barrido o sacudido en seco como método de limpieza en un sitio donde se fabrican productos estériles.

El equipo que genere contaminación debe estar localizado en un área adjunta para ahí efectuarse su sanitización por algún método adecuado; asimismo, deberá ser anotada en una libreta de registro, el material, su sanitización y su fecha en que se efectuó.

Las máquinas dosificadoras tienen un sistema diferente de sanitización ya que se puede ocasionar una oxidación interna o externa en el equipo y como consecuencia una contaminación del producto.

Después de la sanitización del área y equipo, se deja secar sin detener el sistema de aire acondicionado y sin apagar las lámparas de luz ultravioleta.

2.2.2 OXIDO DE ETILENO.

La técnica de esterilización con óxido de etileno es aplicada a aquellos materiales que son sensibles al calor. En la industria farmacéutica se emplea para esterilizar plásticos, equipo médico, tapón y sellos para viales, etc., sin embargo debemos recordar que algunos materiales y fármacos resultan perjudicados por el óxido de etileno, tales como la estreptomina, vitamina B12 y proteínas.

El óxido de etileno en su forma pura tiene las siguientes características: es incoloro, tiene olor etéreo, inflamable y altamente explosivo en presencia de aire, soluble en el agua y en la mayor parte de los solventes orgánicos; por éstas razones requiere ser mezclado con otros gases inertes para reducir las características negativas y permita su manejo; primero se pensó en el uso con la mezcla de O.E. con bióxido de carbono en proporción de 10 % aprox. de O.E. pero los resultados no fueron muy satisfactorios debido a la diferencia en las propiedades de los dos componentes, posteriormente se recurrió al empleo de los derivados clorofluorados del metano: triclorofluorometano (freón 11) y el diclorodifluorometano (freón 12) minimizando así su capacidad inflamable y explosiva.

Se ha encontrado (4) que el O.E. es efectivo para toda clase de microorganismos, para lograr resultados seguros de esterilización deben controlarse factores como concentración de O.E., humedad relativa, temperatura y presión de los cuales es función el tiempo necesario para la esterilización. La penetración del O.E. para esterilizar se produce por difusión y convección. En algunos casos esos factores pueden aumentarse por medio de otros métodos, como circulación forzada o haciendo un prevacío en la cámara de esterilización.

Los equipos que se emplean para esterilizar con O.E. corresponden a diseños comerciales de autoclave para vapor, puede decirse que toda autoclave de ese carácter equipada con una bomba de vacío es útil para esterilizar con O.E. La concentración varía de acuerdo con las características del material y los factores de humedad relativa, temperatura, presión y tiempo pero casi siempre está entre 450-900 mg. de O.E. por litro de autoclave.

Una vez cargado el autoclave y establecidas las condiciones de temperatura y humedad se procede a dar vacío para eliminar en forma más completa posible, el aire de la cámara y el que pueda estar ocluido entre los materiales. Se deja un periodo para estabilizar la presión y se rompe el vacío con el ingreso de la mezcla esterilizante dejándola actuar durante un periodo variable considerando los factores antes mencionados, que por lo general está entre las 6 y las 12 horas.

Al terminar el ciclo de esterilización se procede a hacer nuevamente vacío, se deja un periodo de 15-30 minutos para favorecer la eliminación de O.E. residual y se rompe el vacío por ingreso de aire estéril a través de un filtro, este ingreso de aire puede repetirse para lograr seguridad en la eliminación del O.E. residual.

Cantidades significativas de O.E. pueden provocar reacciones tóxicas al cuerpo humano, en soluciones acuosas irrita el sistema respiratorio, los ojos y la inhalación por un periodo prolongado provoca náuseas vómitos y dolor de cabeza por tal razón es aconsejable tomar las debidas precauciones al manejar este gas empleando el equipo apropiado para esta técnica de esterilización.

Destrucción de los Microorganismos por el Oxido de Etileno. La evidencia indica que la destrucción se debe a una reacción química del gas con la materia orgánica del protoplasma celular, haciendo inactivas las células microbianas, lo que resulta en la esterilidad del producto expuesto a la mezcla gaseosa de óxido de etileno (23).

CAPITULO III IMPORTANCIA DEL PERSONAL

Algunos estudios han permitido establecer que el hombre constituye la principal fuente de contaminantes físicos y biológicos en el área estéril. La concentración está determinada por el número de personas y por su actividad, las ropas o uniformes, la piel en razón de los procesos metabólicos, boca, nariz, zona peritoneal diseminan gran número de partículas. Esto convierte al ser humano en el foco principal de contaminación del área controlada.

El hombre al moverse emite una cantidad de partículas y el número depende del tipo de actividad. El reposo relativo, un suave accionar de la cabeza o brazos, puede liberar de 100 000 a 500 000 partículas mayores de 0.3 micras por minuto, un ejercicio muy liviano le hace producir de 1 a 5 millones de éstas partículas y si se trata de un movimiento más activo, el desprendimiento de éstas partículas puede llegar de 10 a 15 millones. Mientras más enérgico o brusco sea el movimiento, mayor es también el número de partículas eliminadas y hay formación de turbulencias de aire.

Relación de partículas desprendidas en diversos movimientos (18).

TIPO DE MOVIMIENTO	PARTICULAS EMITIDAS/MIN. (mayores de 0.3 micras)
Un pie (según sea movimiento)	100 000
Un ligero mov. de la mano o antebrazo	500 000
Un mov. medio del cuerpo, del brazo o cualquier movimiento del pie.	1 000 000
Alzando con mov. todo el cuerpo	2 500 000
Andar lento a 3.5 Km/hr.	5 000 000
Andar Normal 6.0 Km/hr.	7 000 000
Mov. libre	15 - 30 millones

Los contaminantes muy grandes poseen caracteres físicos y químicos propios, son neutros o cargados de electricidad y se pueden clasificar en (4):

- a) Soportes, que son partículas grandes capaces de adsorber a los gérmenes y sedimentar rápidamente.
- b) Gotitas de saliva, de 1 a 2 mm de diámetro que se mueven en forma constante y rápida en el espacio de la evaporación.

- c) Núcleos de condensación de 2 a 8 micras de diámetro que resultan de la concentración de saliva sedimentan lentamente; contaminando mucho tiempo la atmosfera siendo posteriormente transportadas muy lejos. A menudo su carga es negativa.

Las prendas de vestir constituyen una fuente considerable de contaminación debido a la pelusa que desprenden en mayor o menor cantidad dependiendo del material con el que esté fabricado. Por lo que es importante la selección de las telas y vestimenta, siendo aconsejables los vestidos hechos de fibra poliéster aunque pudiera ser de nylon u otro material sintético similar.

3.1 CARACTERISTICAS DEL PERSONAL.

Las personas escogidas para laborar en áreas estériles deberán cumplir o reunir las siguientes características (1) (36).

- a) Limpias.- En su persona, su ropa, sus costumbres y actos.
- b) Ordenadas.- Esto es muy importante porque sólo con orden se pueden evitar accidentes como caídas, mal manejo de maquinaria.
- c) Responsables.- Para que sus actividades sean dignas de toda confianza.
- d) Honradez.- Para que comuniquen a su inmediato superior cualquier anomalía, falla o error que afecte a los productos.
- e) Capacitación.- El personal debe recibir un curso de capacitación para trabajar en el área estéril.

3.2 LIMPIEZA DEL PERSONAL.

- Las personas deben ser limpias, bañarse y cambiarse todos los días.
- Cepillarse los dientes después de cada comida.
- Debido al gran riesgo que presentan las manos sucias como medio para propagar contaminaciones microbianas; la limpieza de las manos es muy importante.

- Las uñas deberán mantenerse cortas y cepillarse cuidadosamente al lavarse las manos.
- El uso de barniz de las uñas para el personal del área controlada está prohibido.
- El cabello deberá mantenerse limpio, arreglado y de preferencia deberá usarse corto.
- Nunca deberá peinarse o tratarse el cabello en el interior del área controlada .
- Los varones deberán estar bien afeitados.
- No deberá usarse cosméticos que generen contaminantes. Deben evitarse especialmente el maquillaje para ojos, lápiz labial, polvo facial y laca para cabello.

3.2.1 REVISION DEL ESTADO DE SALUD.

- El personal que labora en el área controlada deberá gozar de buena salud.
- Cualquier persona que padezca algún síndrome, afección o estado fisiológico incompatible con el trabajo deberá ser excluida de la manufactura de productos estériles.
- Toda persona que labora en el área controlada está obligada a reportar a su supervisor cualquier enfermedad que padezca.
- Deberá recibir atención médica pronta y deberá mantenerse en observación el tiempo que las circunstancias ameriten.
- Toda persona que esté directamente involucrada en la producción de formas farmacéuticas estériles deberá someterse a revisiones cuya periodicidad será de 3-6 meses.

3.3 COMPORTAMIENTO DEL PERSONAL.

El área controlada, por ser una zona estrictamente delicada requiere de un comportamiento especial del personal que labora dentro de ella para ayudar a evitar la contaminación (37). Este comportamiento se observa desde el momento que entra al área controlada así como dentro de ella.

3.3.1 ENTRADA AL AREA CONTROLADA.

El personal que entra a un área controlada debe de portar un uniforme o equipo especial para ésta área. Debe seguir una técnica adecuada que está detallada en sus manuales de vestido, pero en forma general se trata en este capítulo.

La ropa de calle es portadora de gran cantidad de contaminantes por lo que es necesario despojarse de ellas y sustituirlas por ropa limpia y estéril antes de entrar al área controlada. La ropa que se usa en áreas controlada debe reunir las siguientes características:

- Fabricada de materiales cuya liberación de partículas sea mínima o nula, sin cargarse de electricidad por rozamiento.
- Ser holgada y fresca para permitir el trabajo cómodamente.
- Cubrir el cuerpo completamente sin impedir la visión y respiración. Consta de las siguientes partes (38):
 - Cubreboca.
 - Capucha.
 - Overol.
 - Guantes.
 - Botas.
 - Goggles o Careta.
- Debe haber sido lavado, envuelto y esterilizado antes de cada uso para evitar la contaminación.

El doblado de la ropa es muy importante, debido a que al manipularse al vestir, no debe tocarse la parte externa de la tela y no debe tocar el suelo ninguna de las prendas a excepción de las botas, (debe seguirse la técnica adecuada descrita en sus manuales) por lo que antes de usar la ropa deberá cerciorarse del doblado correcto.

Otra forma de impedir que la contaminación entre al área controlada consiste en seguir una técnica adecuada al entrar a ella.

- La persona al llegar a la planta, se despoja de su ropa de calle y usa el uniforme de planta, cambia su calzado de calle por el de la planta.
- Entrega artículos de ornato al supervisor, no debe usar cosméticos.
- Pasa a la zona de desvestido donde se despoja de la ropa de planta colgandola en sitios adecuados, cambia el calzado de planta por el calzado de área controlada que están destinados exclusivamente para ésta área.
- Prosigue al lavado de manos siguiendo la técnica detallada en el manual del área.
- Selecciona un uniforme de talla adecuada y verifica que haya sido esterilizado y la fecha en que se realizó sea reciente. Verifica la presencia de guantes y cubrebocas adicionales, pasa a la zona de vestido.
- Se prosigue al vestido siguiendo la técnica adecuada.

Todas las personas que entren a área controlada es necesario que se les capacite en cada una de las técnicas usadas para evitar la contaminación.

Es importante importante mencionar el orden apropiado de colocarse las diferentes prendas estériles.

- Lavarse las manos.
- Se coloca el cubreboca y gorro desechable.
- Se coloca la capucha.
- Se desdobra el overol y se coloca cuidando que no arrastre el suelo, cuidando que la capucha quede en el interior del overol.
- Se ponen las botas cuidando de no pisar zonas contaminadas.
- Se debe verificar el buen vestido frente a un espejo.
- Se colocan los goggles y por último se colocan los guantes.

La ropa usada dentro del área controlada no debiera usarse fuera de ella y los uniformes estériles deberán cambiarse a diario.

3.3.2 COMPORTAMIENTO DENTRO DEL AREA CONTROLADA.

- Si se sienten deseos de estornudar o toser al laborar en el área controlada deben retirarse a la antecámara adjunta y hacerlo ahí tan suavemente como sea posible, luego se procederá a quitar el cubreboca, colocándose uno nuevo y se enjuagarán los guantes con una solución especial desinfectante. El cubreboca sucio deberá depositarse en un basurero provisto de tapa.
- En caso de que el estornudo o la tos haya ocurrido con la cara orientada hacia el área crítica, deberá separarse de inmediato el producto sin tapar expuesto durante el accidente y se tomarán las medidas indicadas.
- El uso del pañuelo esta estrictamente prohibido en el área controlada, si su uso es imperativo, la persona deberá utilizar pañuelos desechables y enjuagar posteriormente los guantes con una solución desinfectante.
- No se deberá caminar o mover innecesariamente dentro del área y al hacerlo los movimientos deberán ser tan lentos y suaves como sea posible.
- No deben comer, fumar o masticar chicle en el interior del área controlada.
- La conversación entre las personas que laboran en el área controlada deben evitarse lo más posible.
- Los objetos personales como llaves, monedas, cigarrillos, cerillos, lapices, pañuelos, relojes y peines no deberán introducirse al área.
- Las manos enguantadas deberán mantenerse estrictamente sobre el material de trabajo. Debe evitarse tocar o apoyarse en cualquier superficie para disminuir los riesgos de contaminación del producto, por medio de las manos.
- Deben evitarse toda clase de manierismos nerviosos tales como rascarse la cabeza, tallarse las manos o partes del cuerpo y actitudes similares.
- Cualquier objeto ya sea herramienta o parte de los utensilios de trabajo que caiga al suelo no volverá a usarse sino que deberá ser sustituido por otro igual.
- Siempre se deben usar guantes estériles y herramientas asépticas cuando se trabaje en condiciones de esterilidad.
- Las operaciones de mantenimiento del área debe ser restringida durante la operación normal del área controlada.

CAPITULO IV VALIDACION DE UN AREA CONTROLADA PARA LA ELABORACION DE PRODUCTOS ESTERILES

La comprobación de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso se ha llamado "validación". Es evidente además, que el elemento humano responsable, eficiente y adecuadamente capacitado, constituye la parte medular de un sistema completo de control de calidad (38).

Dentro de la industria farmacéutica, una de las etapas de mayor importancia en la fabricación de medicamentos, es el proceso de validación, ya que mediante él se determinarán las variables por controlar, con el objeto de garantizar la fabricación consistente de un producto. Un programa de validación implica el poner mayor énfasis en lo que hacemos y en mantener un mejor control en la documentación de tales actividades. Antes de validar, serán necesario efectuar una evaluación del equipo seleccionado, ésto implica la necesidad de optimizar el proceso para asegurar así, la credibilidad de los datos.

La FDA caracteriza a un proceso como "fuera de control" a menos que haya sido validado y mantenido dentro de esos límites. Es una prueba del sistema que surge de los resultados obtenidos preferentemente durante la fase de desarrollo del medicamento y se continúa durante la etapa de fabricación e incluye a sistemas auxiliares como aire, agua, materiales empleados y personal.

El proceso de validación se define como el reto intencionado a un proceso (durante su desarrollo) para determinar cuales variables deben ser controladas para asegurar la producción consistente de un producto o sus intermedios.

Las características de calidad, seguridad y efectividad se encuentran dentro de los medicamentos, éstas son impartidas durante el proceso de manufactura por lo tanto no deben ser verificadas únicamente en el producto terminado (31).

Todas y cada una de las etapas de un proceso de manufactura deben conocerse y controlarse de tal manera que se tenga la certeza de que aquellas variables que afectan la calidad, seguridad y efectividad de los medicamentos se mantienen uniformes y que cada producto terminado cubre consistentemente todas las especificaciones de calidad y diseño.

La finalidad de cualquier compañía farmacéutica es producir medicamentos que cumplan ampliamente con el propósito que pretenden y para el cual fueron creados.

Los elementos de un proceso de validación son (40):

- Validación Prospectiva.
- Validación Retrospectiva.

Validación Prospectiva.- Se refiere a comprobar a través de un plan experimental denominado "protocolo de validación", que un proceso realiza lo que está destinado a hacer antes de comercializar un producto; requiere normalmente de un alto grado de experimentación preliminar a nivel de desarrollo.

El programa de validación prospectiva incluye:

- Características del producto.
- Especificaciones de aceptación del producto.
- Equipo, calificación de las instalaciones, calificación del funcionamiento del proceso
- Un sistema que asegure una revalidación oportuna.
- Documentación.

Validación Retrospectiva.- Se refiere a analizar resultados históricos de tal manera que evidenciamos, en un documento, que un proceso realiza lo que está destinado a hacer. Este tipo de validación requiere de técnicas estadísticas de análisis.

La revalidación puede ser periódica y nos estaremos refiriendo a una validación retrospectiva o en el caso de que ocurran cambios se efectuará una validación del tipo prospectiva.

La validación debe incluir la preparación de los protocolos y la documentación sobre el equipo, las pruebas de calificación para demostrar la eficiencia del proceso y la certificación final.

La documentación debe incluir evidencias de:

- Elección y calidad de los materiales.
- Funcionamiento y seguridad del equipo.
- Funcionamiento y seguridad de las instalaciones.
- Competencia del personal.

La documentación sobre el equipo debe incluir la descripción y los planos del autoclave u horno, los sistemas de tubería, los sistemas de instrumentación, las instalaciones de respaldo y cualquier equipo crítico que pueda afectar las condiciones del proceso.

Etapas del proceso de validación para productos o procesos:

- Establecer las características que se desean del producto.
- Establecer especificaciones de aceptación.
- Seleccionar y evaluar el proceso y el equipo.
- Establecer procedimientos de manufactura que proporcionen monitoreos adecuados.
- Mantener un sistema de aseguramiento de calidad el cual sea revisado cuando sea apropiado.
- Especificar métodos de muestreo y análisis.

El proceso de validación es un programa destinado a establecer evidencia documentada, que permita asegurar con alto grado de confianza y teniendo en cuenta el estado de los conocimientos y el arte farmacéutico, que a través de un proceso específico se obtiene o se obtendrá un producto que reúna todas las especificaciones y atributos de calidad preestablecidos.

El proceso de validación consiste en:

- Definir las características del producto.
- Identificar las características claves del producto.
- Determinar las etapas críticas del proceso para asegurar las características claves.
- Diseñar y dirigir experimentos para controlar las etapas claves del proceso.

- Seleccionar los límites del proceso y las especificaciones del producto "proceso".
- Establecer ensayos de procedimientos de producción y completar la documentación de pre-producción.
- Revisión y aprobación de control de calidad, normas reglamentarias, manufactura y desarrollo.
- Correr ensayos de producción.
- Redefinir los parámetros del proceso y las especificaciones si es necesario.

Las etapas principales en el desarrollo de un programa de validación son los siguientes:

- Obtener datos experimentales para determinar el rango de cada parámetro.
- Establecer las especificaciones límite de los datos experimentales para cada parámetro determinado.
- Determinar en que grado las especificaciones límite nos indican que el proceso está bajo control.
- Certificar el equipo que usamos en la obtención de los datos y control del proceso.

La validación empieza con el diseño inicial del área de trabajo como el esfuerzo mancomunado profesional de ingenieros, diseñadores y químicos farmacéuticos biólogos que la firma farmacéutica elige. La fase de diseño es el resultado de desarrollo de planos, dibujos y especificaciones de trabajo. Los puntos clave para la validación serán: clase de cuarto, equipo de producción y los sistemas de soporte (como control de calidad y áreas de almacenamiento) son los ingredientes esenciales de los parámetros de diseño (8) (17).

La literatura ha reportado algunas razones fundamentales para llevar a cabo el proceso de validación (15) (27) (41).

- Es un requerimiento estipulado en las Buenas Prácticas de Manufactura (de algunos países), que establece los requerimientos mínimos que un producto debe satisfacer.
- El resultado final de la validación será obtener medicamentos de calidad uniforme y reproducible a la altura de los mejores fabricantes internacionales.
- Deseo de mejorar costos y/o evitar gastos (reducción de rechazos y tiempos muertos, identificación rápida de

problemas, mejor productibilidad, reducción de análisis, etc.)

- Integración de áreas funcionales en equipo.
- Provocar una sensación de "buen negocio", introduciendo un nuevo producto con un buen soporte de su historia técnica.
- Posibilidad de convertirse en un requisito reglamentado a corto plazo.
- Tener el objetivo de cero defectos-cero rechazos.

Costo de un Programa de Validación.

Cualquier tentativa para determinar el costo efectivo de los programas de procesos de validación es sometido a consideraciones económicas. Debido a que no se trata aún de un requerimiento legal obligatorio para todas las firmas de productos y procesos, puede parecer un gasto innecesario, considerando lo cuantioso que resultan ser los programas de calibración de equipo y los estudios de estabilidad y sumado a ésto la necesidad de llevar la acumulación de la documentación de los datos de validación se puede pensar que involucra un trabajo adicional.

La validación representa un costo extra a nivel de desarrollo para establecer atributos y especificaciones del producto, determinar proceso y equipo y evaluar los procesos en condiciones críticas; ésto constituye un reto ya que debe ajustarse a la capacidad financiera de la empresa. También constituye un costo moderado por entrenamiento del personal. Otros costos pueden absorberse si el mismo personal existente realiza la validación con eficiencia siguiendo un plan adecuado, de acuerdo a recursos humanos de la empresa. Generalmente se tiene la necesidad de asesoría especializada de alto nivel en ingeniería y desarrollo industrial (39) (40).

En algunas situaciones se requiere mucho más que las validaciones retrospectivas conducidas a través de datos existentes. Este tipo de investigación, particularmente cuando va encaminado a corregir causas de desviaciones de producción, podría aportar recomendaciones positivas para prevenir futuros problemas o desviaciones de producción. Así que junto a un proceso de validación viene una revalidación que es un ejercicio que requiere de revisión y aprobación por un comité de Re-Validación para que pueda ser oficial. Muchas desviaciones futuras pueden ser prevenidas por éste procedimiento.

El objetivo primordial del proceso de Re-Validación será el de obtener "cero defectos" y "cero rechazos" y de ésta manera se podrá estimar el beneficio financiero de los procesos de validación.

4.1 EVALUACION DE FILTROS HEPA

Para la producción aséptica de productos estériles son indispensables cuartos de flujo laminar y/o estaciones de aire puro filtrado a través de filtros HEPA; pruebas iniciales y rutinarias se deben llevar a cabo para asegurar la velocidad, la integridad y el buen funcionamiento de los filtros HEPA, entre las cuales tenemos las siguientes (42) (43):

- Pruebas de reto con DOP.
- Prueba de integridad y patrones de flujo.
- Velocidad y presión.

4.1.1 PRUEBA DE RETO CON DOP.

Una aproximación analítica para determinar la efectividad de un cambio de aire en un cuarto se prevee extremadamente compleja, debido a los muchos parámetros involucrados; éstos incluyen (44) (45) (46):

- a) Método de iluminación.
- b) Configuración de las salidas de aire.
- c) Método de difusión del aire.
- d) Altura del techo.
- e) Diferencias de temperatura del aire suministrado.
- f) Tamaño del área y configuración.
- g) Equipo en el área.
- h) Tamaño de partículas.

Fué por ésto diseñado un método empírico para tener la determinación de la efectividad de un sistema, habiendo considerado muchos sistemas. El uso de gas halocarbónico fué contemplado pero tuvo que descartarse, debido a que el gas no puede removerse fácilmente del sistema de recirculación.

El sistema que más fácilmente fué adoptado es el que usa dioctil ftalato (DOP). Las partículas generalmente son muy cercanas a 0.3 micras de diámetro y tamaño uniforme. Esas partículas poseen buenas características de difusión y para los propósitos de éste análisis, son afectadas por la gravedad de manera insignificante. Una partícula de 0.3 micras, se asentará en una proporción de no menos de una pulgada por hora.

Se han efectuado muchos análisis experimentales para determinar la factibilidad de usar DOP así como muchos fotómetros de prueba para determinarlo.

Determinación de los Coeficientes de Limpieza para un Área Usando Humo de DOP.

El coeficiente de limpieza, se define como la cantidad de tiempo requerido para reducir el nivel de DOP en un espacio cerrado, de 100 microgramos por litro a 1 microgramo por litro.

Procedimiento de la prueba.

a) Preparación.

- El sistema de aire acondicionado debe estar funcionando y balanceado.
- El cuarto debe estar libre de todo personal.
- Los filtros deben ser analizados por estándares de DOP.

b) Inicio del Análisis.

- Coloque el generador de humo de DOP en el área de trabajo a por lo menos un metro del suelo. Esto es necesario para proveer un medio de operación del generador desde fuera del cuarto.
- Coloque el probador manual en la entrada del retorno o un registrador en el piso, de ésta forma, se asegurará que todas partículas en el retorno sean uniformes.

- Coloque el fotómetro junto al cuarto por la parte de afuera de manera que pueda ser operado durante la prueba. Calibre el fotómetro según las instrucciones de manufactura.

c) Desarrollo de la Prueba.

- Comience a generar el humo de DOP dentro del cuarto.
- Cuando el fotómetro indique una concentración de 100 microgramos/litro detenga la generación de DOP.
- Continúe observando el fotómetro y cuando se muestre la lectura de 100 microgramos/litro comience a computar el tiempo de reducción de la concentración.
- Efectúe lecturas a intervalos de 5 a 30 segundos hasta que se alcancen lecturas de 1 microgramo/mililitro o menores.

Este procedimiento ha sido usado en los últimos años reportando resultados con alto grado de reproducibilidad realizando ensayos en un mismo cuarto.

Como un estándar para la comparación de la eficiencia, consideremos un cuarto teórico ideal con un flujo laminar perfecto, en donde un cambio de aire desaloja completamente todo el aire y los contaminantes que en él existen y comparando todos los sistemas con éste.

$$t_{\text{teórico}} = \frac{V}{F}$$

en donde:

$t_{\text{teórico}}$ = tiempo de un cambio de aire

V = volumen del cuarto

F = flujo de aire que ingresa al cuarto

Con ésta base, cuando el tiempo de un cambio de aire se divide entre el coeficiente de limpieza y se multiplica por 100 se obtendrá la eficiencia de limpieza del sistema.

$$\text{Eficiencia de limpieza} = \frac{t_{\text{teórico}}}{t_{\text{coeficiente de limpieza}}} \times 100$$

El resultado obtenido del coeficiente de limpieza de la prueba proporciona una valiosa información de ingeniería. Por sí misma indica un valor absoluto de limpieza en el cuarto, cuando éste es dividido entre el tiempo teórico de un cambio de aire del cuarto y multiplicado por 100 se obtendrá para el sistema el porcentaje de eficiencia de limpieza.

4.1.2 INTEGRIDAD Y PATRON DE FLUJO.

Esta prueba nos dará la información de la integridad de los filtros y direcciones que lleva el flujo de aire y nos muestra además si hay turbulencia dentro del área crítica que es lo que se trata de evitar.

Se hace con la formación de un humo denso, que se obtiene al poner en contacto con el oxígeno al tetracloruro de titanio. El humo que se forma toma las direcciones que lleva el aire demostrando las zonas de turbulencia.

La integridad de los filtros HEPA es también determinada con el cuenta partículas Royko, de tal manera que si se registra un número elevado de partículas esto indicará que existe la probabilidad del que el filtro presente fugas debido a roturas (45).

4.1.3 VELOCIDAD Y PRESION.

La velocidad y presión del aire son dos parámetros importantes de controlar. Es necesario controlar la velocidad de inyección del aire, para evitar turbulencias provocadas por altas velocidades, causando una contaminación de los productos que ahí se elaboran. Esa velocidad debe ser adecuada, permitiendo los cambios de aire requeridos para mantener una presión positiva.

Con la puerta de entrada cerrada una diferencia de presión mínima de 0.10 pulgadas de columna de agua, debe ser mantenida entre el cuarto limpio y la sección estéril, esto asegurará una velocidad de salida del flujo de aire del cuarto limpio cuando la puerta de entrada esté abierta. Una diferencia de presión mínima de 0.05 pulgadas de columna de agua debe ser mantenida entre la sección limpia y la de vestido, de modo que cuando la puerta es abierta deberá haber una velocidad de salida de flujo de la sección limpia (5).

Una diferencia de presión mínima positiva de 0.01 pulgadas de columna de agua debe ser mantenida entre la sección de vestido y la de desvestido, de modo que deberá haber una velocidad de salida de flujo de aire de la sección de vestido (la diferencia de presión es medida con la puerta de entrada cerrada).

La presión en un sistema de ductos es medida frecuentemente con un manómetro inclinado, que está lleno con un líquido que será desplazado por presiones ejercidas en cualquiera de los extremos. Una escala móvil permite la calibración del instrumento en cero, cuando está expuesto a la presión atmosférica solamente.

En el trabajo normal de aire acondicionado, no es necesario generalmente determinar la presión de velocidad. Sin embargo la velocidad en términos de desplazamiento o movimiento en pies por minuto si es importante, porque está relacionada con el ruido y el balanceo de un sistema.

Un instrumento usado para medir la velocidad del aire que sale por un suministro, es el anemómetro. Consiste en unas aspas montadas en un eje que gira cuando se introduce en una corriente de aire. En el centro está un indicador que muestra la velocidad en pies/minuto. Un cronómetro es necesario para tomar registros a distintos tiempos. Algunas situaciones pueden requerir que el anemómetro trabaje por más de un minuto. Mientras más dure el registro los promedios serán más exactos (3).

4.2 EVALUACION DE SANITIZANTES

La eficacia de las operaciones de limpieza y sanitización deben ser evaluadas continuamente. Varias técnicas para evaluar dichas operaciones, se han desarrollado con respecto a la forma de la superficie que se va a examinar y la naturaleza de la información requerida, pero todas tienen por objetivo asegurar que las instalaciones y el equipo estén adecuadamente limpios y así reducir la posibilidad de contaminación (25) (47).

La evaluación de los sanitizantes se lleva a cabo en el laboratorio siguiendo uno de los tres métodos siguientes, donde en cada uno de los casos el agente desinfectante se ensaya con respecto a un microorganismo elegido.

- 1.- Los productos líquidos, solubles en agua, en solución convenientemente diluida, se colocan en tubos de ensayo a los que se les agrega una cantidad medida de organismo testigo a intervalos de tiempo determinados, se transfiere una alícuota de éstos tubos a unos de medio de cultivo esterilizado, que se incuban, observándose la aparición de crecimiento. Por éste método también se puede determinar el número de organismos muertos por unidad de tiempo.
- 2.- Se incorpora el agente químico a un medio de agar o caldo, se inocula el organismo testigo, se incuban y se observan:
 - Disminución de la intensidad de crecimiento.
 - Ausencia total de crecimiento.
- 3.- Se inocula una placa de agar con el organismo testigo y se deposita el agente químico desinfectante, ya sea por discos de papel filtro impregnados con el desinfectante o por cilindro placa. Después de una incubación se observará una zona de inhibición de crecimiento, alrededor del lugar donde se depositó el agente antimicrobiano.

La comprobación del método de sanitización se hace con las pruebas de placas de contacto Rodac y Swabs.

La frecuencia con la que se hacen estas evaluaciones debe ser dos veces al año por lo menos. Los límites de aceptación serán los considerados posteriormente en las pruebas de placas de contacto Rodac y Swabs.

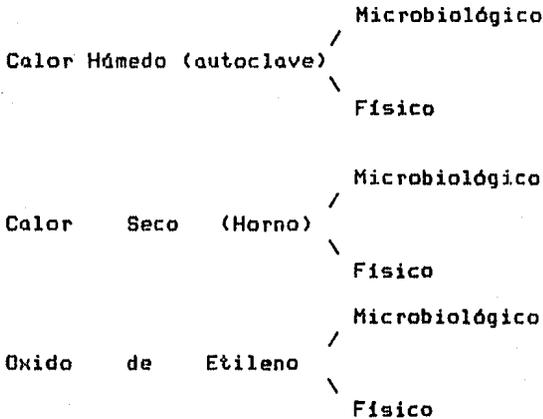
4.3 EVALUACION DE CICLOS DE ESTERILIZACION

Los estudios de validación de los ciclos de esterilización son diseñados para demostrar que la distribución del calor es uniforme y que el proceso de letalidad alcanzado en el ciclo de esterilización en el punto más frío de la carga es (26):

- a) Suficiente para asegurar esterilidad.
- b) Reproducible para los parámetros del ciclo operacional usado y para el modelo de carga máximo definido.

La validación de un nuevo proceso de esterilización definido por nuevas condiciones para el ciclo debido a nuevo equipo, diferente al ordinario, incluye un mínimo de calificaciones planeadas en las cuales deben satisfacerse todos los criterios de aceptación delineados en el protocolo. Cada equipo de esterilización debe calificarse independientemente (29).

Los diferentes métodos de esterilización requieren una evaluación tanto física como microbiológica



Calor Húmedo y Calor Seco.

Cualquiera que sea el método de esterilización empleado y por rigurosos que hayan sido los controles de temperatura, presión, tiempo, etc., durante el desarrollo de un proceso es aconsejable que se realice un control final del producto esterilizado y se puede controlar por medio de (14) (26) (27) (28):

- Introducción de indicadores físicos.- Que sufren modificaciones en su estructura, generalmente por ablandamiento o fusión de las substancias que los componen por ejemplo ácido benzoico que funde de 121-123 grados centígrados y sulfatiazol que funde entre 200-204 grados.
- Introducción de indicadores químicos.- Estos indicadores sufren modificaciones generadas por el agente de esterilización sobre reactivos que los componen y que generalmente se ponen en evidencia por cambios de color sobre indicadores de pH.

Sin embargo, el uso de éstos indicadores no representa ninguna garantía real sobre la esterilidad del producto terminado, es por éste motivo que se fueron perfeccionando los indicadores biológicos y la forma de aplicarlos.

Indicadores Biológicos.- Sirven para demostrar la efectividad de un proceso de esterilización dado, empleando un cultivo de una sola especie conocida de microorganismo en cualquier de las dos formas siguientes:

- a) Añadiendo el cultivo al contenido de las unidades representativas del lote por esterilizar y/o a sus envases.
- b) En el caso de algunos sólidos, agregando el cultivo a discos, tiras de papel filtro, cuentas de vidrio, plástico o metal, que simulan muestras del producto, las cuales deben ser lo más parecido en composición al producto o envase por esterilizar.

Si se trata de un líquido y no es conveniente añadir indicadores biológicos a las unidades representativas del lote, también se puede agregar el indicador, como en el caso antes mencionado, a un producto simulado, que ofrezca la misma resistencia a la esterilización que el producto en cuestión.

Al emplear los indicadores biológicos se deben considerar los siguientes factores (4):

- Que tengan una resistencia al agente esterilizante superior a cualquier germen que pueda contaminar la muestra.
- Que se cumpla la cinética de la destrucción de los microorganismos que actúan como indicadores biológicos en relación con el proceso de esterilización a emplear.

Cuadro 4.I Bioindicadores Propuestos por la USF XXI para los Diferentes Ciclos de Esterilización.

Esterilización	Microorganismo
Vapor	B. stearothermophilus
Calor seco	C. tetani (cepa no patógena)
Oxido de etileno	B. subtilis (var. niger)
Radiaciones ionizantes	B. pumilus

- Que su colocación en la carga represente las mismas condiciones de exposición que el resto de los elementos por esterilizar.
- Que el número de muestras que se colocan en la autoclave comprenda todos los sitios donde pueda haber variaciones significativas del agente de esterilización.
- Que se emplee un medio de recuperación seguro.
- Que se haya eliminado cualquier substancia bacterioestática que pueda acompañar al indicador biológico.

La penetración del calor y la distribución de temperaturas en la cámara esterilizante, debe evaluarse usando sensores para temperatura, diseñando un patrón de colocación rastreable que es justificado por las características del proceso de manufactura. Los sensores de temperatura para la penetración de calor deben colocarse dentro del recipiente de productos de acuerdo con los resultados de los estudios de distribución de temperatura del producto.

Condiciones de Carga del Autoclave y Horno.

Los estudios de calificación deben llevarse a cabo utilizando las cargas máximas de los autoclaves u hornos ó bien cargas críticas cuando ésto sea apropiado. También requiere efectuar la calificación en aquellas que sean carga mínima.

Si los estudios con carga mínima y máxima muestran entre sí variaciones significativas en el proceso, deberán correrse estudios con cargas intermedias.

Biovalidación.

Esta fase del proceso debe incluir:

- Un programa de verificación continua del ambiente microbiano.
- Desafío adecuado con indicadores biológicos.
- Evaluación de la carga microbiana de pre-esterilización y de su resistencia térmica.

Certificación.

La documentación, incluyendo protocolo, datos y resultados obtenidos con el equipo y la calificación del proceso así como durante la validación, debe ser revisado por el responsable(s) adecuado(s) quien(es) debiera(n), mediante una certificación, dar la aprobación.

Debe planearse una calificación sencilla a efectuarse periódicamente para verificar de manera continua la ausencia de cambios indeseables que pudieran pasar inadvertidos. También debe planearse una calificación sencilla siempre que se realice una modificación en el equipo para demostrar que el proceso de esterilización no ha sido alterado.

Oxido de Etileno.

La esterilización con óxido de etileno es un proceso complejo ya que factores tales como estratificación del gas, temperatura y humedad pueden limitar o incrementar la dinámica de esterilización con óxido de etileno.

Los factores que pueden afectar el proceso de esterilización deben, por lo tanto, ser revisados apropiadamente. Para completar estos análisis son usados termopares para evaluar la distribución y penetración del calor dentro de la cámara y el producto. Además, para evaluar la eficacia del proceso se usan concentraciones conocidas de microorganismos con gran resistencia al óxido de etileno, dichos controles integran los efectos de temperatura, humedad y concentración de óxido de etileno (38).

En la esterilización por óxido de etileno se deben establecer los modelos de carga mínima y máxima de la misma manera que los parámetros de esterilización en autoclave y horno.

Evaluación Física.

Al efectuar la evaluación física de los ciclos de esterilización con óxido de etileno se determina:

- a) Distribución de calor.- Estos estudios se llevan a cabo para determinar la uniformidad de temperatura dentro de la cámara, ya que puntos calientes y fríos y/o estratificación de temperatura pueden ocasionar estratificación de gases o una reducción de humedad relativa. Este estudio se realiza, tanto para cámara vacía como para el modelo de carga máxima.
- b) Penetración de calor.- Debido a la dificultad para medir la penetración del gas y de la humedad, se escoge a la temperatura como indicador de los sitios más difíciles de esterilizar, ésto asume que la efectividad del gas será más baja en los puntos fríos dentro de la carga y cámara.

Existe una técnica para evaluar la esterilización por óxido de etileno, que permite medir la penetración del gas a través de un sobre de polietileno, el sobre contiene una solución de cloruro de magnesio y un indicador de pH.

Se colocan sobres de polietileno que contengan 3, 6 y 12 ml de una solución ácida de cloruro de magnesio al 11.8% que contenga como indicador rojo de metilo y se cierran por calor; la liberación de ácido clorhídrico por acción de óxido de etileno sobre el cloruro de magnesio determina el viraje del indicador.

Evaluación Microbiológica.

Al efectuar la evaluación microbiológica de los ciclos de esterilización con óxido de etileno se determina:

Estudios de Reproducibilidad.- Los puntos más fríos identificados en los estudios se monitorean otra vez en un estudio final para verificar la reproducibilidad de la penetración del calor. Se pone en cada punto esporas de *Bacillus subtilis*.

Resultados.

- a) Se determina la desviación de la temperatura máxima a intervalos de 30 minutos durante el periodo de exposición, sin tomar en cuenta la primera hora de esterilización. El promedio de éstas desviaciones no debe exceder de 5.5 grados Centígrados.
- b) Todas las tiras de esporas deben inactivarse.

4.4 VALIDACION MICROBIOLOGICA DEL AREA

El proceso aséptico es una de las operaciones más exigentes en la industria farmacéutica y requiere ser validado para asegurar en un lote la calidad del producto. En el proceso aséptico el mayor interés estriba en la calidad del producto, aseguramiento de la esterilidad para los productos y la disponibilidad de obtener constantemente el nivel de esterilidad asegurada.

La validación pretende establecer que el proceso aséptico lo es verdaderamente en cualquiera de sus etapas. Algunas etapas básicas para la validación del sistema son (41) (48):

- Prácticamente diseñando los componentes del área y sistemas.
- Desafiando el sistema (probando sistemas y métodos).
- Monitoreando el sistema (anotando los efectos del desafío).
- Evaluando el sistema (evaluando los datos para determinar en donde realmente puede llevarse a cabo la evaluación del sistema para los estándares pretendidos).

Así que el sistema de validación es necesario para acordar sobre el criterio aceptable de validación (previo) para enfocar el desafío. Las pruebas de desafío empleadas y la interpretación de resultados debe ser constante para que el ejercicio de validación sea significativo.

Validación Prospectiva del Area.

Para un proceso de producción una proposición para la validación podría ser (41):

- a) Auditar el área para asegurar que todo el equipo instalado satisfaga el criterio de ingeniería, diseño, calidad prometida y estén funcionando correctamente.
- b) Evaluar los patrones de flujo y calidad de aire en áreas críticas, usando patrones de humo, contadores de partículas y monitoreos microbianos de aire para asegurar aire de excelente calidad y existan patrones de flujo. Esta evaluación puede llevarse a cabo en los siguientes cuatro casos para demostrar que el sistema funciona adecuadamente.

- El área crítica sin equipo de proceso y sin personal.
- El área crítica con equipo de proceso (pero no funcionando) y sin personal.
- El área crítica con equipo de proceso funcionando normalmente y sin personal.
- El área crítica con equipo funcionando (llenando producto) y personal presente realizando operaciones normales.

Esta área crítica puede ser monitoreada para partículas viables durante las actividades antes mencionadas. Este monitoreo de calidad de aire deberá continuarse hasta que se demuestre que se tiene un estado confiable.

- c) Realizar pruebas de simulación del proceso y continuar el monitoreo de área crítica (aire y superficie expuesta) para partículas viables.
- d) Revisar los datos generales de las actividades antes mencionadas y determinar si las operaciones realizadas han sido convenientes. Un efecto de ésta revisión podría ser para redefinir límites en el punto que se haya demostrado ser razonable.

Es necesario realizar, por lo menos, dos pruebas de simulación de proceso antes de liberar la producción normal de un producto al mercado.

Métodos para Validar el Proceso de Llenado Aséptico.

La validación del proceso de un llenado aséptico involucra consideraciones de dos tipos:

- Ambiente inmediato del producto (contenedor, fármaco, superficie crítica), el cual ha sido previamente esterilizado.
- Ambiente donde estos materiales previamente esterilizados son reunidos y procesados en forma de dosis final.

4.4.1. MONITOREO AMBIENTAL.

El ambiente del cuarto de llenado es la última ocasión, antes del sellado del producto en su contenedor final, en el cual la contaminación ambiental podría ocurrir. Esta contaminación puede deberse a cualquier sedimento de microorganismo suspendido en el aire o malos procedimientos de manipulación que podrían iniciar la contaminación (49).

Monitoreo Microbiano y Evaluación del Aire.

El equipo empleado en la evaluación microbiológica y monitoreo del aire deberá estar sujeto a una calibración rutinaria. El medio de soporte de desarrollo microbiano deberá probarse y demostrar su efectividad (incluye muestreo y condiciones de manipulación a los niveles a las cuales se expondrá el medio).

El fabricante deberá tomar las medidas necesarias para establecer niveles de las cuentas bacterianas y cuando estos niveles sean excedidos se aplicará una acción correctiva bien planeada. Esta acción correctiva debe ser bien diseñada para colocar el área en el estado de validación óptima y de ser posible para determinar la causa que ocasionó la desviación de los niveles normales de cuentas bacterianas.

La localización del muestreo de aire debe llevarse a cabo en aquellos lugares dentro del proceso en los que el producto presente el mayor potencial de contaminación ambiental; la prueba de humo puede ayudar a la identificación de éstas áreas.

Existen una serie de métodos para el monitoreo microbiano y la evaluación del aire, el fabricante puede seleccionar el método más apropiado de acuerdo a su situación y necesidades, los siguientes son algunos de los más comunes:

- a) Método cualitativo.
- b) Método cuantitativo.

Método Cualitativo.

Cuenta de Placa.— Este es uno de los métodos más ampliamente usados para el monitoreo de organismos viables del aire en áreas de llenado aséptico. Las cajas petri conteniendo medio de cultivo microbiológico se exponen en el medio ambiente, los organismos colonizan la superficie del medio en el cual se desarrollan después de una incubación adecuada. Cualquier microorganismo presente será identificado y evaluado de acuerdo a los niveles establecidos por el fabricante.

Esta técnica cualitativa básica es simple, portátil y económica; no requiere de procedimientos de subcultivos y permite monitoreos continuos que son de gran eficiencia.

La exposición de cajas petri con medio de cultivo en las áreas de producción permite evaluar la contaminación microbiana del aire en dichas áreas. Esta evaluación constituye un control en proceso que permite la detección de cualquier mal funcionamiento de los filtros HEPA y cualquier desviación de buenas prácticas de manufactura.

La localización de éstas placas es muy importante, por lo menos deben exponerse dos placas (rutinariamente) continuamente durante el proceso de validación; una placa debe exponerse tan cerca como sea posible al equipo de llenado y la localización de la otra placa dependerá del historial del área, seleccionando anticipadamente el supuestamente más crítico o desfavorable de los sitios.

Criterio.- La cuenta óptima de la placa deberá ser cero después de 30 min. de exposición u ocasionalmente 1 a 2 microorganismos. Cuentas de 3 o más microorganismos en una placa de la misma área crítica indicarán la necesidad de una investigación para tomar las medidas correctivas que se requieran.

Métodos Cuantitativos.

El fabricante deberá establecer la velocidad de muestreo y los niveles de acción, se puede tomar como referencia la cuenta de 1 microorganismo/10 pies cúbicos de aire muestreado el cual será disponible por flujo de aire laminar (45) (46) (49).

Muestreador de Impacto.- Este muestreador emplea una placa rotatoria que contiene un medio de cultivo con agar, debajo de una rejilla fija tipo orificio. El volumen de aire muestreado debe ser en relación con el nivel de contaminación esperado del cuarto. Este método es portátil, eficiente, tanto cualitativo como cuantitativo, proporciona una relación entre concentración y tiempo y no requiere de procedimientos de subcultivo. El equipo requiere de una fuente de vacío, algunos modelos tienen integrada una bomba de vacío, sin embargo esto implica que debe tenerse mayor cuidado en la limpieza y aspiración de la bomba. La unidad entera no puede ser esterilizada por vapor pero puede ser sanitizada con agentes sanitizantes apropiados como el alcohol al 70%, algunas partes pueden ser desmontadas y esterilizadas por separado. Este instrumento no puede ser empleado durante operaciones de llenado de polvos sin tomar precauciones o modificaciones para prevenir daños en el equipo.

Muestreador de Centrifuga Reuter.- Este aparato es operado con baterías y proporciona aire a 40 lts./min a través de sus aspas, las partículas del aire son lanzadas por fuerza centrifuga frente a un sustrato de agar. El volumen de aire muestreado debe ser en relación con el nivel de contaminación esperado del cuarto. La unidad es portátil, conveniente y no requiere de fuente de poder ni de vacío, las partes de la unidad pueden ser esterilizadas por vapor.

Líquido Impingement.- El aire es aspirado dentro de la unidad por medio de vacío, el volumen de aire aspirado es determinado por un orificio capilar limitante, las partículas y microorganismos presentes en el aire son incididos en el líquido a muy alta velocidad, al final del período de muestreo, la solución en la cual fué inversido el aire es filtrado a través de un filtro de membrana y este es manipulado y tratado como se describe en la sección de filtro de membrana.

La unidad es económica, altamente eficiente y cuantitativa, porque se tiene la relación de alta velocidad del flujo de aire adicionado y las diluciones realizadas de tal forma que se pueda obtener el número real de microorganismos. Las unidades de vidrio son fácilmente limpiadas y esterilizadas pero deben tratarse con esmero adecuado debido a su frágil construcción. Se requiere de una fuente de vacío para la operación del aparato. En la colectación del fluido (generalmente solución salina) puede ser necesaria la adición de agentes antiespumantes. El número de placas y diluciones requeridas dependerá del nivel de contaminación esperado. Cada tipo de aparato (de líquido impingement) tiene sus propias características de operación en cuanto a velocidad de flujo y volumen de aire muestreado.

Filtración por Membrana.- El aire es aspirado a través de un filtro de membrana por un período de tiempo determinado anticipadamente en relación al nivel de contaminación del cuarto. Los filtros de membrana son colocados sobre un medio nutriente para promover el desarrollo de colonias formadas por unidades; éste método es económico y permite el muestreo prácticamente en cualquier localización. Este método es recomendado en el muestreo de manufactura.

Impactor de Malla o de Cascada.- Este tipo de colectores de cascada o de malla de impacto de partículas es de acuerdo al tamaño de las partículas sobre placas llenas con medio de cultivo nutriente, el medio es incubado y posteriormente se cuentan las colonias. Es portátil, eficiente y no requiere de procedimientos de subcultivos; la unidad requiere de una fuente de vacío para su operación, la alta velocidad del aire usada en el aparato debe ser vigilada para evitar el secado del medio de cultivo.

4.4.2 MONITOREO MICROBIANO Y EVALUACION DE SUPERFICIES.

Placas de Contacto Rodac.— Las placas de contacto son preparadas con un medio de soporte que contenga agar, se preparan de tal forma que el medio resalte de las paredes de la caja petri, las superficies del medio estéril se aplica por un deslizamiento sobre la superficie que se va a probar (prueba de superficie plana), inmediatamente se coloca la tapa de la placa y se incuba; cualquier colonia presente es considerada para determinar la contaminación del área (45) (46) (49).

Esta técnica es indicada para monitoreo suave de superficie plana tal como: equipo, paredes, pisos, guantes y ropa de operadores. Se deben tomar ciertas precauciones para asegurarse de que el medio residual sea removido de la superficie probada, esto se logra limpiando con un agente apropiado como el alcohol esterilizado. Si se emplean desinfectantes para sanitizar el equipo, el medio de cultivo empleado en las placas de contacto podría ser inactivado y para evitar tal inactivación es conveniente adicionar lecitina o tween al medio empleado para neutralizar la acción del sanitizante.

Estas placas se emplean para pruebas de superficies tan cercanamente como sea posible a la zona crítica de la operación aséptica (máquinas llenadoras, tolvas de tapones). Las superficies de paredes y pisos en el área crítica deben ser monitoreadas suficientemente durante la validación y después periódicamente para asegurar la sanitización adecuada y la muerte bacteriana.

Criterio.— Para superficies críticas la cuenta debe ser cero aunque cuentas de 1 o 2 colonias podrían ser aceptables si se probaran una o más superficies, ésta técnica es recomendada para el monitoreo microbiano en guantes de operadores.

Swabs.— Empleando técnicas asépticas los swabs esterilizados son sumergidos en un medio de cultivo líquido o diluyente estéril, estos son frotados sobre la superficie de prueba y colocados en un medio de incubación apropiado. El número de colonias por unidad de área puede determinarse usando técnicas microbiológicas estándar como cuenta de placa.

Los swabs son indicados para superficies irregulares, ésta técnica es más indicada para validación cualitativa que cuantitativa. La superficie probada con swabs puede ser estandarizada para una área constante (4 pulgadas cuadradas es el área recomendada); la cuenta debe ser cero siempre en áreas críticas.

4.4.3 PRUEBA DE SIMULACION DE PROCESO.

El llenado aséptico de un fármaco es un proceso que presenta numerosas oportunidades de contaminación del producto final, es por esto que la evaluación del ambiente y de las técnicas involucradas en la manufactura y llenado de éstos productos son críticas, para minimizar la posibilidad de contaminación (38) (46) (49).

Las pruebas de simulación de proceso permiten evaluar todo el equipo, procedimiento y ambiente asociados con el proceso de un producto estéril, cuando la prueba se lleva a cabo correctamente se checa la validez y adaptabilidad de (16):

- Filtración estéril.
- Esterilización de recipientes.
- Esterilización de equipo de proceso.
- Condiciones ambientales del área de llenado.
- Prácticas de manufactura.

La simulación de un proceso aséptico de manufactura empleando un medio de cultivo microbiológico es una herramienta sensitiva y valiosa en toda la validación del proceso de manufactura microbiológica aceptable. Los resultados de esta prueba pueden emplearse para la detección e identificación de algún paso del proceso que esté fallando el cual puede ser la fuente de contaminación microbiológica del producto final.

Consideraciones del Medio de Cultivo Empleado en la Prueba de Simulación de Proceso. (14) (27) (49)

- a) Tipo del medio.- Varios medios microbiológicos pueden emplearse en el programa de validación del proceso, en general cuando se selecciona un medio debe tenerse en cuenta las siguientes características:
- Selectividad.- El medio debe tener baja selectividad para soportar el desarrollo de un amplio espectro de microorganismos incluyendo hongos y levaduras.
 - Filtrabilidad.- El medio no debe contener agar ni altos niveles de sólidos suspendidos cuando se emplean para el proceso de filtración.
 - Claridad.- El medio debe ser claro de tal forma que facilite la observación de la turbidez ocasionada por la contaminación.

TSG - Digerido de caseína soya es uno de los medios más comúnmente empleados debido a su baja selectividad y relativamente bajo costo, sin embargo existen otros aceptables, entre ellos se pueden incluir los siguientes:

TGYE Extracto de levadura-glucosa-triptosa.

BHI Infusión cerebro corazón.

NIH Tioglicolato (si se desea un crecimiento anaerobio).

b) Concentración del medio.- El fabricante determinará la concentración del medio para la prueba de simulación de proceso de acuerdo a sus necesidades internas.

c) Utilización del medio.- Para el desarrollo de la prueba de simulación del proceso se pueden emplear dos técnicas:

- Usar medio no esterilizado y filtrado por membrana esterilizante normal. El medio puede ser prefiltrado para reducir la biocarga e incrementar la eficiencia de filtración.

- Pre-esterilizar el medio en una operación por separado, después verificar la esterilidad del medio; usar el medio para la prueba de simulación de proceso, pasar el medio esterilizado a través del equipo de proceso normal.

d) Esterilización del medio.- La esterilización del medio empleado en la prueba de simulación de proceso puede llevarse a cabo por medio de calor húmedo (autoclave) o filtración. El método elegido depende de la disponibilidad del equipo indicado y la información diseñada para el estudio.

Esterilización con calor.- Cuando este método es empleado es recomendable que:

- El medio debe ser solubilizado y distribuido dentro de un recipiente con cierre adecuado para permitir el intercambio de gas filtrado y para distribuir las subsiguientes en la línea de llenado.

- El medio deberá ser expuesto a vapor bajo presión en un ciclo de esterilización validado para lograr una probabilidad de 0.0000001 (uno por diez a la menos siete) organismos supervivientes en el medio.

- El medio deberá ser enfriado lentamente para prevenir el exceso de ebullición.

- El medio debe emplearse inmediatamente después de su preparación.

Esterilización por filtración.- Cuando se emplea éste método es recomendable que:

- El medio debe ser solubilizado a una temperatura de 50 grados centígrados para facilitar la solubilidad de los sólidos.
- La filtración debe realizarse bajo las condiciones normales de producción usando un filtro con grado de esterilización con prefiltración adecuada.
- El medio puede ser almacenado en recipientes estériles voluminosos después de la filtración para asegurar que la técnica aséptica usada fué adecuada.

Parámetros de la Prueba de Simulación de Proceso.

- a) Programación.- Las pruebas de simulación de proceso son desarrolladas independientemente de las corridas normales de producción con la línea de llenado preparada específicamente para la prueba, éstas pruebas podrían ser realizadas a varios tiempos durante los cambios de producción normal.
- b) Número de contenedores.- La cantidad de contenedores llenados durante la prueba deberá reconocer uno o más de los criterios siguientes (donde sea posible):
 - El número de contenedores requeridos para la prueba debe ser definido así como el número de contenedores de llenado normalmente en un periodo de llenado dado cuando el equipo esté operando a velocidades normales.
 - El número de contenedores llenados, probados puede ser definido en términos de un periodo de tiempo predeterminado cuando el equipo esté operando a velocidades de llenado normales.
 - La prueba de simulación de proceso deberá ser tal que haya suficientes contenedores y que sean llenados para determinar apropiadamente la proporción de contaminación.
- c) Velocidad de llenado.- El equipo debe ser operado a velocidades de producción normal.

- d) Volumen de llenado.- El volumen de llenado de medio en cada contenedor durante una prueba de simulación de proceso debe equivaler al volumen de un producto llenado normalmente, esto es necesario para simular derrames del contenedor por el medio, tan bien como se simulan las condiciones de exposición experimentadas durante la producción normal. Si se emplean volúmenes de llenado menores, la equivalencia de esta desviación de la situación de la producción normal debe ser documentada.

Parámetros del Medio de Incubación.

- a) Técnica.- Los contenedores llenados con medio deben ser suavemente rotados inmediatamente antes de su incubación de tal manera que todas las superficies incluyendo los cierres, sean humedecidos por el medio. El contenedor debe ser incubado en posición vertical con el cierre en la parte superior, ésta postura minimiza la migración de ingredientes que pudiera afectar la promoción del crecimiento característico del medio.
- b) Tiempo.- Los contenedores sellados son liberados de la línea de producción y deberán ser incubados por un mínimo de 14 días.
- c) Temperatura.- Los contenedores de la prueba deben ser monitoreados durante el período de prueba y deberán ser mantenidos dentro del rango de temperatura especificado para el período elegido.
- d) Controles positivos.- Estos deberán ser incubados bajo condiciones idénticas que los contenedores de prueba.

Análisis e Interpretación de la Prueba de Simulación de Proceso.

Siguiendo el periodo de incubación apropiada el medio de los contenedores llenados deberá examinarse visualmente para desarrollo microbiano.

Los contenedores contaminados deben ser examinados para evidenciar daños de contenedores y cierres, lo cual podría ser una falla de la integridad del sistema de empaclado. Los contenedores dañados no deben ser considerados en los resultados de la validación. Cuando los contenedores son dañados se establece una investigación para determinar las causas posibles y tomar la acción correctiva apropiada.

La identidad de los microorganismos dentro de los contenedores contaminados deberá ser determinada, ésta identificación deberá incluir como mínimo colonia y morfología celular así como también las características de la tinción de Gram.

El nivel de contaminación en la prueba de simulación de proceso (cuando existe desarrollo positivo) puede ser determinado usando la siguiente fórmula (49).

% nivel de contaminación =

$$\frac{\text{No. de contenedores con crecimiento microbiano}}{\text{No. tot. de cont. llenados} - \text{No. de cont. contaminados}} \times 100$$

Un método para la identificación de contenedores dañados es empleando una tinta o solución surfactante sumergiendo los contenedores y expuestos al vacío bajo presión con parámetros especificados de tiempo y severidad de exposición.

Esta es la responsabilidad de cada fabricante para establecer el punto final aceptable de la prueba de simulación de proceso; un punto final ampliamente aceptado del nivel de contaminación para la prueba es de 0.3%, sin embargo es sugerido que los fabricantes deban esforzarse por un nivel de contaminación menor de 0.1%.

Si ocurre una falla en la prueba de simulación de proceso durante el monitoreo de rutina se deberá considerar en los estudios de validación posteriores; un programa de seguimiento consistirá en una revisión por producción así como por control de calidad, aseguranza de la calidad y otros grupos funcionales y deberá ser iniciado para revisar:

- Datos ambientales.
- Registros de esterilización.
- Registros operacionales.
- Otros datos relacionados con la prueba.

La repetición de la prueba deberá realizarse tan pronto como sea posible, si el nivel de contaminación de la repetición es mayor que el punto final establecido, el proceso de validación no es considerado a ese nivel.

La acción investigativa deberá iniciarse inmediatamente para identificar la causa del crecimiento del nivel de contaminación y las acciones correctivas deberán ser tomadas, el proceso de revalidación no puede ser considerado hasta que por lo menos 2 pruebas de simulación de proceso consecutivas sean aceptables.

Cuadro 4.II PROGRAMA DE MONITOREO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL (46)

Elemento	Rodac	Swabs	Expo.de cajas	Rejillas de Aire	Otros
Pared y pisos	x	x			
Area controlada	x	x	x	x	
Area crítica	x	x	x		
Filtros de aire				x	DOP, integridad velocidad
Equipo de producción		x			
Equipo de llenado		x			* P.S.P.
Mangueras lin. llen.					* P.S.P.
Hornos y autoclaves				x	Testigo biológico y físico
Sanitizantes	x	x			Cuenta cilindro placa
Luz ultravioleta			x		Lectura de intensidad

* P.S.P. - Prueba de Simulación de Proceso.

CAPITULO V PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

5.1 EVALUACION DE FILTROS HEPA

La evaluación de los filtros HEPA que se llevó a cabo es la microbiológica, mediante la exposición de cajas petri en las entradas de aire al área controlada. Los resultados de la prueba con IQP no fueron facilitados por la empresa y únicamente se reportó como: "resultados satisfactorios".

CONDICIONES DE LA PRUEBA:

- La circulación del aire será siempre la misma durante los días de prueba.
- El monitoreo se llevó a cabo durante 10 días consecutivos con equipo en el área y sin personal operando y 10 días en condiciones normales de trabajo.
- Uniforme apropiado para área controlada.

MATERIAL EMPLEADO:

- Incubadoras a 20 y 35 grados centígrados.
- Cajas petri esterilizadas de 15 x 100 mm. con medio de cultivo de agar soya-tripticaseína y con agar de saboraud.

PROCEDIMIENTO:

- Exponer 2 placas con medio de cultivo de agar soya tripticaseína y de agar de saboraud a una distancia de 30 cm. aprox. de cada una de las entradas de aire.
- Exponer por tres minutos.
- Condiciones de incubación. Las cajas petri con medio de cultivo de agar de soya-tripticaseína se incubaron a 35 grados centígrados por 72 horas y las cajas petri con medio de cultivo de agar de saboraud fueron incubadas a 20 grados centígrados durante 5 días.

RESULTADOS:

- No se observó desarrollo microbiano después del tiempo de incubación en las cajas petri con medio de cultivo expuestas en las entradas de aire durante los 20 días de la prueba.

5.2 MEDICION DE LA INTENSIDAD DE LAS LAMPARAS DE LUZ UV

La evaluación de las lámparas de luz UV se realizó tomando lecturas de la intensidad de la luz UV en cada lámpara, considerando los valores de intensidad óptimos entre el 60 % y el 100 % del valor teórico reportado por la casa proveedora. Para el tipo de lámpara que se probó se considera un 100 % de intensidad al 7.7 microwatts/cm² por lo tanto, el 60 % será de 4.62 microwatts/cm².

MATERIAL EMPLEADO:

- Lienzo humedecido con alcohol isopropilico al 70 %.
- Medidor de intensidad de luz UV.
- Equipo adecuado para área controlada.

PROCEDIMIENTO:

- Se limpia cuidadosamente la lámpara que se va a probar con un lienzo humedecido con alcohol isopropilico al 70 %.
- Se coloca el sensor del aparato para medir la intensidad de luz UV a 1 cm aprox. de la lámpara.
- Se efectúan 3 lecturas en cada lámpara (extremo derecho, centro y extremo izquierdo). A una distancia de 5 cm aprox. del electrodo a lo largo de la lámpara.
- El tiempo para tomar la lectura es de aprox. 2 minutos que es el tiempo necesario para estabilizar la sensibilidad, esto es, que no se presente una variación mayor de 5 centésimos.
- Se determinaron lecturas en cada una de las lámparas que muestran las figuras 5.1 y 5.2.

RESULTADOS

Los resultados que muestra el cuadro 5.I es el promedio de las tres lecturas en cada lámpara. La evaluación se realizó dos veces con dos meses de diferencia.

Cuadro 5.I LECTURAS DE INTENSIDAD DE LA LUZ UV

LAMP	SECC. DE LLENADO DE ANTIBIOTICOS (POLVOS)		SECC. DE LLENADO DE LIQUIDOS	
	1a. Determ. microwatts	2a. Determ. microwatts	1a. Determ. microwatts	2a. Determ. microwatts
1	8.43	6.38	6.01	6.70
2	7.44	6.29	6.89	7.39
3	7.35	6.67	7.07	6.25
4	7.68	6.79	7.51	7.55
5	7.55	6.37	6.47	6.67
6	7.33	6.71	7.34	6.11
7	7.76	6.83	7.55	6.67
8	6.94	6.33	6.93	6.47
9	7.55	6.31	6.96	7.03
10	7.89	6.99	7.13	6.58
11	7.87	6.92	7.24	6.70
12			7.48	6.71

CRITERIO:

Si el promedio de las tres lecturas es menor de 4.62 microwatts/cm² se deberá cambiar la lámpara. Si el promedio es mayor de 4.62 y menor o igual a 7.7 microwatts/cm², se considera una lámpara eficiente y si el promedio es mayor de 7.7 microwatts/cm² se considera una lámpara en muy buen estado.

5.3 VALIDACION DE CICLOS DE ESTERILIZACION

Para comprobar que el tiempo de esterilización es correcto y la distribución de calor es uniforme dentro de la cámara esterilizante, se realiza la validación del ciclo de esterilización.

Esta validación se realizó por dos métodos diferentes:

- a) Método físico. En el método físico se usaron dos procedimientos para determinar que la distribución de temperatura es uniforme en toda la cámara de esterilización y éstas fueron:
 - Utilizando termómetros de máxima certificados y un termopar integrado a un graficador.
 - Utilizando indicadores físicos para autoclave (ácido benzoico p.f. 121 grados centígrados) y horno (sulfatiazol p.f. 200-204 grados centígrados).
- b) Método microbiológico. En el método microbiológico se utiliza como indicador biológico para autoclave *Bacillus sterothermophilus*.

CONDICIONES DE LAS PRUEBAS:

- a) Autoclave:
 - Con carga.
 - Sin carga.
- b) Horno:
 - Con carga.
 - Sin carga.
- c) Equipo de seguridad adecuado para manipular autoclave y horno.

MATERIAL EMPLEADO:

- Autoclave y Horno.
- Indicadores físicos y biológicos.
- Frascos ampula y ampolletas.
- Termómetros de máxima certificados.
- Carro esterilizador.
- Ampolletas con producto.

PROCEDIMIENTO PARA AUTOCLAVE:

- Se utilizaron ampolletas selladas conteniendo 50 mg. aprox. de ácido benzoico (p.f. 121 grados centígrados) como indicador físico colocadas en 9 diferentes posiciones para tener mayor seguridad en los resultados. Al final del tiempo de esterilización se sacaron las ampolletas y se observó su estado físico.
- Se colocaron termómetros de máxima en 9 posiciones diferentes, los cuales se sacaron al terminar el tiempo de esterilización tomándose la temperatura de éstos para verificar la distribución de calor.
- Se colocaron ampolletas con *B. sterothermophilus* como testigos biológicos en las mismas posiciones que los indicadores físicos. Después de la esterilización se incubó a 55 grados por 48 horas, pasando el tiempo de incubación se observó si presentan desarrollo.

Las posiciones empleadas son las siguientes:

- 1.- Extremo izquierdo superior frente.
- 2.- Extremo izquierdo superior fondo.
- 3.- Extremo derecho superior fondo.
- 4.- Extremo derecho superior frente.
- 5.- Centro.
- 6.- Extremo izquierdo inferior frente.
- 7.- Extremo izquierdo inferior fondo.
- 8.- Extremo derecho inferior fondo.
- 9.- Extremo derecho inferior frente.

RESULTADOS:

Cuadro 5.II RESULTADOS DE AUTOCLAVE

Posiciones	Temperatura		Indicadores	
	sin carga	con carga	biológico	físico
1	121.5	120.0	negativo	*positivo
2	121.5	120.5	negativo	positivo
3	121.5	120.0	negativo	positivo
4	123.0	121.0	negativo	positivo
5	120.0	120.5	negativo	positivo
6	123.0	120.5	negativo	positivo
7	122.5	120.0	negativo	positivo
8	121.0	121.0	negativo	positivo
9	122.0	121.0	negativo	positivo
gráfica	123.0	124.0		

*positivo = alcanzó el punto de fusión.

Condiciones de esterilización:

- Presión = 15 lb/cm².
- Temperatura = 121 grados centígrados.
- Tiempo = 35 minutos.
- Indicador Biológico = B. sterothermophilus.

PROCEDIMIENTO PARA HORNO:

- Se utilizaron ampollitas selladas conteniendo 50 mg. aprox. de sulfatiazol (p.f. 205 grados centígrados) como indicador físico colocadas en 5 diferentes posiciones para tener mayor seguridad en los resultados. Al final del tiempo de esterilización se sacaron las ampollitas y se observó su estado físico.
- Se colocaron termómetros de máximo en 5 posiciones diferentes, los cuales se sacaron al terminar el tiempo de esterilización tomándose la temperatura de éstos para verificar la distribución de calor.
- Como testigo biológico se aconseja utilizar esporas de C. tetani, que no fué posible usar por ser altamente patógeno, por lo tanto en la esterilización con carga se tomó una muestra de 15 viales por posición a los cuales se les efectuó la prueba de esterilidad, tomando los resultados como los de un testigo biológico.

Las posiciones empleadas son las siguientes:

- 1.- Extremo superior fondo.
- 2.- Extremo superior frente.
- 3.- Centro.
- 4.- Extremo inferior fondo.
- 5.- Extremo inferior frente.

RESULTADOS:

Cuadro 5.III RESULTADOS DE HORNO No. 1

Posiciones	Temperatura		Indicadores	
	sin carga	con carga	biológico	físico
1	200.0	206.0	negativo	*positivo
2	209.0	208.0	negativo	positivo
3	205.0	205.0	negativo	positivo
4	200.0	200.0	negativo	positivo
5	205.0	205.0	negativo	positivo
gráfica	210.0	210.0		

*positivo = alcanzó el punto de fusión.

Cuadro 5.IV RESULTADOS DE HORNO No. 2

Posiciones	Temperatura		Indicadores	
	sin carga	con carga	biológico	físico
1	200.0	200.0	negativo	*positivo
2	205.0	203.0	negativo	positivo
3	205.0	203.0	negativo	positivo
4	203.0	206.0	negativo	positivo
5	205.0	205.0	negativo	positivo
gráfica	210.0	210.0		

*positivo = alcanzó el punto de fusión.

Condiciones de esterilización:

- Temperatura = 200 grados centígrados.
- Tiempo = 120 minutos.
- Indicador Biológico = Prueba de esterilidad.

5.4 VALIDACION MICROBIOLOGICA DEL AREA

La validación microbiológica del área se realizó mediante el monitoreo de superficie y de medio ambiente.

Evaluación de Superficies.

Este monitoreo se realizó en las parte más críticas del área de acuerdo al criterio del departamento de control de calidad, en las zonas blanca y crítica.

CONDICIONES:

- Las condiciones ambientales deberán ser idénticas a las normales de trabajo.
- El monitoreo se realizó durante 10 días: 5 días con equipo en el área y sin personal laborando y 5 días con personal laborando normalmente.
- Uniforme apropiado para área controlada.

MATERIAL EMPLEADO:

- Incubadoras a 20 y 35 grados centígrados.
- Cajas petri esterilizadas de 15 x 100 mm. con medio de cultivo de agar de soya-tripticaseína y con agar de saboraud.
- Isopos estériles dentro de tubos de ensayo que contengan 2 ml. aprox. de solución amortiguadora de fosfatos PH=7.2 de tal manera que permanezcan húmedos para poder efectuar el raspado de la superficie a probar.

PROCEDIMIENTO:

- Monitoreo de equipo (máquinas llenadoras, selladoras, engargoladoras y bandas) y accesorios; se hace un raspado de una superficie de 10 x 10 cm. por medio de un isopo y se siembra en estria sobre placas con medio de cultivo de agar de soya-tripticaseína y con agar de saboraud.
- Monitoreo de pared y puertas; se realiza en cada posición a 5 cm. del ras del piso, a la altura de la mesa de trabajo y lo más alto que se pueda, tomando muestras de un área de 10 x 10 cm. empleando un isopo diferente para cada altura y se siembra en estria sobre los medios de cultivo de agar de soya-tripticaseína y con agar de saboraud.

- Condiciones de incubación. Las cajas petri con medio de cultivo de agar de soya-tripticaseína se incubaron a 35 grados centígrados por 72 horas y las cajas petri con medio de cultivo de agar de saboraud fueron incubadas a 20 grados centígrados durante 5 días.

RESULTADOS:

No se observó desarrollo microbiano en ninguna de las muestras tomadas.

Monitoreo de Medio Ambiente.

El monitoreo ambiental del área de fabricación de productos estériles se realizó en las posiciones indicadas en las figuras 5.1 y 5.2 por considerar que son las zonas de mayor riesgo de contaminación.

CONDICIONES DE LA PRUEBA:

- La circulación del aire será siempre la misma durante los días de prueba.
- El monitoreo se llevó a cabo durante 10 días consecutivos con equipo en el área y sin personal operando y 10 días en condiciones normales de trabajo.
- Tiempo de exposición 30 minutos.
- Uniforme apropiado para área controlada.

MATERIAL EMPLEADO:

- Incubadoras a 20 y 35 grados centígrados.
- Cajas petri esterilizadas de 15 x 100 mm. con medio de cultivo de agar soya-tripticaseína y con agar de saboraud.

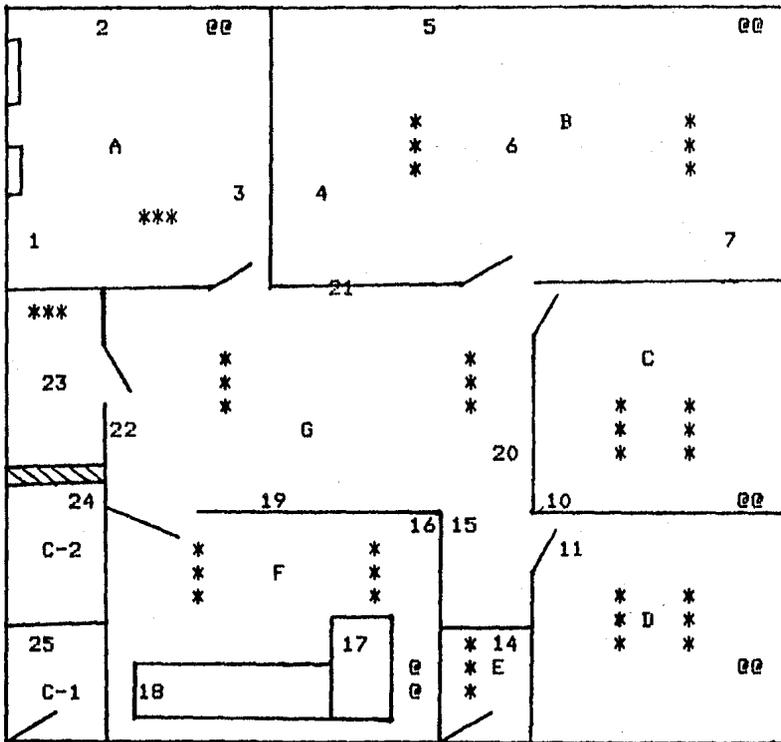


Fig. 5.2 Distribución de cajas petri para el muestreo del medio ambiente en área controlada para preparación y llenado de líquidos.

- *** Lámparas germicidas
- @@ Entradas de aire filtrado
- A Esterilización
- B Manufactura
- C Llenado de ampollitas
- D Llenado de ampollitas
- E Esclusa
- F Llenado de fresco ampula
- G Pasillo de distribución

- C-1 Cuarto de desvestido
- C-2 cuarto de vestido

Colocación de cajas petri:
@@,1,2,3,... 25

PROCEDIMIENTO:

- Colocar 2 placas una con medio de cultivo de agar de soya tripticaseína y la otra con agar de saboraud, en cada una de la posiciones indicadas en las figuras 5.1 y 5.2.
- Exponerlas durante 30 minutos.
- Condiciones de incubación. Las cajas petri con medio de cultivo de agar de soya-tripticaseína se incubaron a 35 grados centígrados por 72 horas y las cajas petri con medio de cultivo de agar de saboraud fueron incubadas a 20 grados centígrados durante 5 días.

RESULTADOS:

Al finalizar el ciclo de incubación se sacaron las cajas petri y se realizó la cuenta de colonias que se desarrollaron. Los resultados son agrupados por zona de trabajo (zonas crítica, blanca, gris y negra) y se muestran en los cuadros del 5.V al 5.VIII.

La representación gráfica de número de microorganismos productores de colonias encontrado en cada zona de trabajo, corresponde al número más alto repetitivo durante el día de prueba debido a que si se considerara el promedio se estaría hablando de fracciones de microorganismos siendo esta situación irreal, por lo tanto, al considerar al número más alto se puede decir que se encuentran, cuando más, el número reportado.

Se grafican los valores encontrados en zona crítica y blanca para observar como varía la contaminación durante las dos fases de validación con y sin personal, tanto en sección de llenado de antibióticos como de líquidos.

Las figuras 5.5 y 5.6 representan la variación de contaminación en las diferentes zonas de trabajo comparando las dos fases de la validación con y sin personal.

Cuadro 5.V

RESULTADOS DE LA EVALUACION MICROBIOLOGICA AMBIENTAL DE LA SECCION DE LLENADO DE ANTIBIOTICOS (POLVOS), CON EQUIPO Y SIN PERSONAL DENTRO DEL AREA

		D I A S D E P R U E B A										
		Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zona	5	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
cri-	6	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
tica	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	8	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
prom.		0.25	0	0.75	0.25	0.50	0.50	0	0	0	0	0.25
*		1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
zona	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
	2	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
b	3	0	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1
l	4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
a	9	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
n	10	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
c	11	0	0	0	0	2	0	1	0	1	1	1
a	12	4	0	1	2	1	1	0	0	1	1	0
prom.		0.75	0.37	0.63	0.37	1.00	0.63	0.37	0.25	0.63	0.50	
*		1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
z.gris	13	6	3	3	4	1	1	0	0	1	0	
z.neg.	14	6	7	4	4	2	1	1	1	2	0	

* Número más alto repetitivo.

Cuadro 5.VI RESULTADOS DE LA EVALUACION MICROBIOLOGICA AMBIENTAL DE LA SECCION DE LLENADO DE ANTIBIOTICOS (POLVOS), CON EQUIPO Y PERSONAL DENTRO DEL AREA LABORANDO NORMALMENTE

	Pos	D I A S D E P R U E B A									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zona	5	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
cri-	6	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
tira	7	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	8	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2
prom.		0.50	0.25	0	0	0	0.50	0.75	0.25	0.75	1.00
*		1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
zona	1	1	1	0	0	1	0	1	0	2	2
	2	0	0	1	1	1	1	2	1	2	3
b	3	1	1	1	0	0	0	1	2	2	2
l	4	0	1	0	0	0	1	0	2	1	1
a	9	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1
n	10	0	1	1	2	0	0	1	1	1	3
c	11	0	0	1	0	0	2	2	1	2	3
a	12	1	0	2	0	1	2	1	1	2	1
prom.		0.37	0.50	0.75	0.37	0.37	0.87	1.12	1.12	1.75	2.00
*		1	1	1	2	1	2	1	1	2	3
z.gris	13	0	0	0	0	4	3	0	0	3	1
z.neg.	14	3	0	2	0	4	3	0	1	4	2

* Número más alto repetitivo.

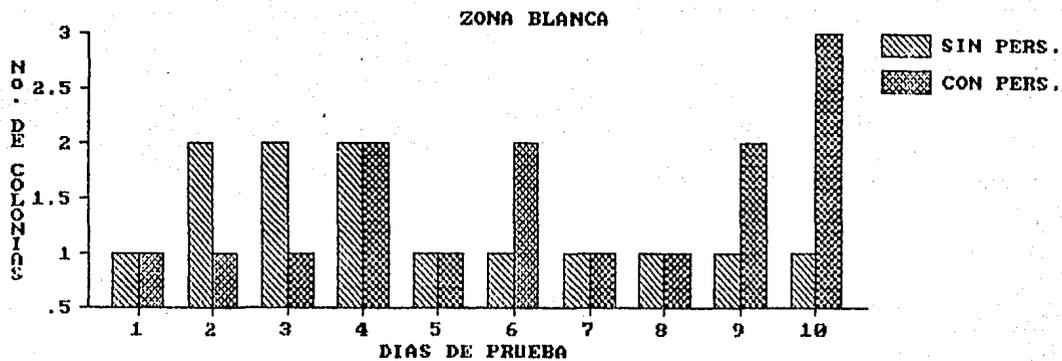
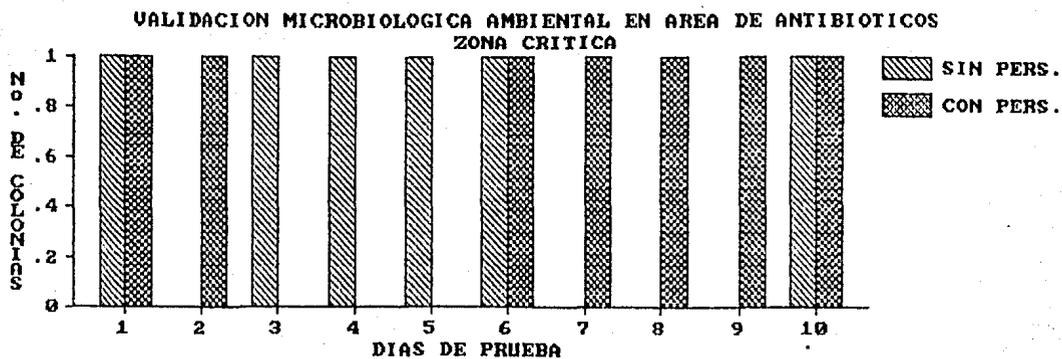


Fig. 5.3

VALIDACION MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL EN AREA DE ANTIBIOTICOS
SIN PERSONAL

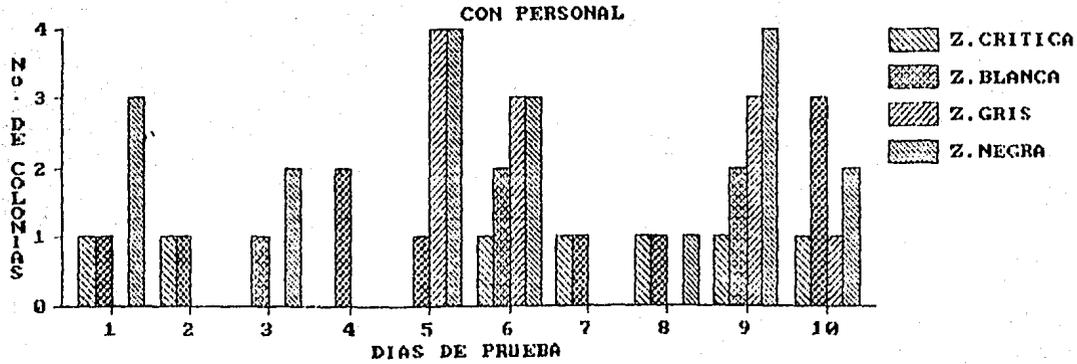
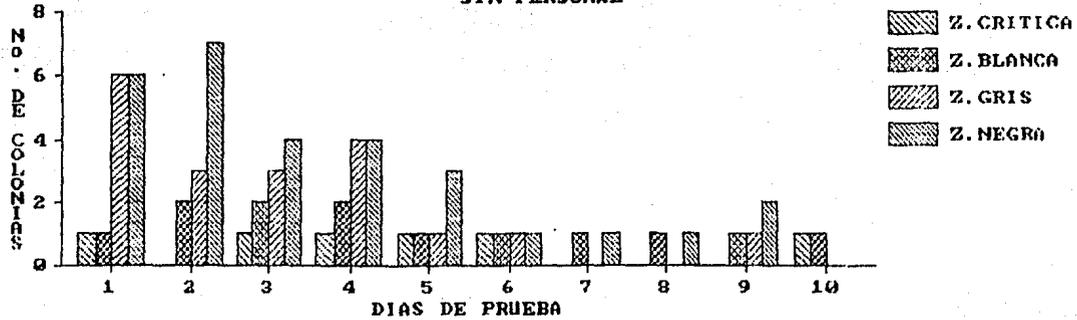


Fig. 5.4

Cuadro 5.VII

RESULTADOS DE LA EVALUACION MICROBIOLOGICA AMBIENTAL DE LA SECCION DE PREPARACION Y LLENADO DE SOLUCIONES, CON EQUIPO Y SIN PERSONAL DENTRO DEL AREA

		D I A S D E P R U E B A											
		Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
zona cri- tica	10	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	11	0	1	2	1	2	2	0	0	0	0	1	
	17	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
	18	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
prom.		0.75	0.25	1.00	0.50	1.25	0.75	0.25	0.25	0	0.25		
*		2	1	1	1	1	2	1	1	0	1		
z o n a	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	2	1	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	
	3	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
	4	3	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
	5	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
	6	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
	7	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8	0	4	0	1	2	0	0	0	0	0	0	
	9	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
b l a n c a	13	1	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	
	14	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	
	15	1	2	2	1	2	0	0	1	1	1	1	
	16	0	2	1	2	2	0	1	0	0	0	0	
	19	1	5	1	3	2	0	0	4	1	0	0	
	20	1	1	1	1	2	0	1	3	0	0	0	
	21	2	3	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
	22	1	2	2	2	2	0	1	1	1	1	1	
	23	3	3	2	2	2	1	0	0	1	1	1	
	prom.		1.00	1.30	1.20	1.00	1.20	0.40	0.15	0.52	0.31	0.15	
	*		1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	
z.gris	24	1	7	3	1	11	0	0	0	0	1		
z.neg.	25	18	8	14	5	13	2	1	1	0	3		

* Número más alto repetitivo.

Cuadro 5.VIII RESULTADOS DE LA EVALUACION MICROBIOLOGICA AMBIENTAL DE LA SECCION DE PREPARACION Y LLENADO DE SOLUCIONES, CON EQUIPO Y PERSONAL DENTRO DEL AREA LABORANDO NORMALMENTE

		D I A S D E P R U E B A										
		Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zona cri- tica	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	17	0	1	0	0	1	0	0	1	1	2	0
	18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
prom.		0,25	0,50	0	0,50	0	0	0	0,25	0,25	0,75	0,25
*		1	1	0	1	0	0	0	1	1	2	1
z o n a b l a n c a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	14	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3
	15	1	0	1	1	1	1	0	2	1	0	1
	16	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
	19	0	1	1	1	1	2	0	1	1	1	1
	20	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1
	21	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	2
	22	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
	23	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	1
	prom.		0,26	0,21	0,42	0,26	0,31	0	0,47	0,26	0,31	0,89
	*		1	1	1	1	1	0	1	1	1	2
	z.gris	24	1	0	1	0	1	0	1	2	3	1
	z.neg.	25	0	2	4	1	4	1	1	4	4	2

* Número más alto repetitivo.

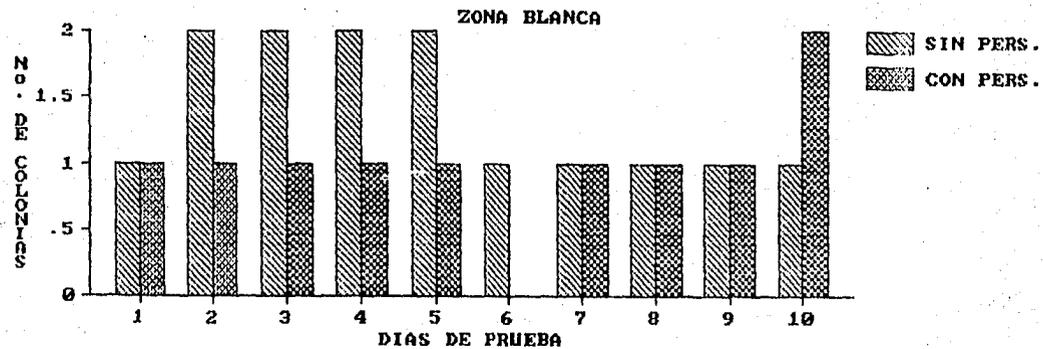
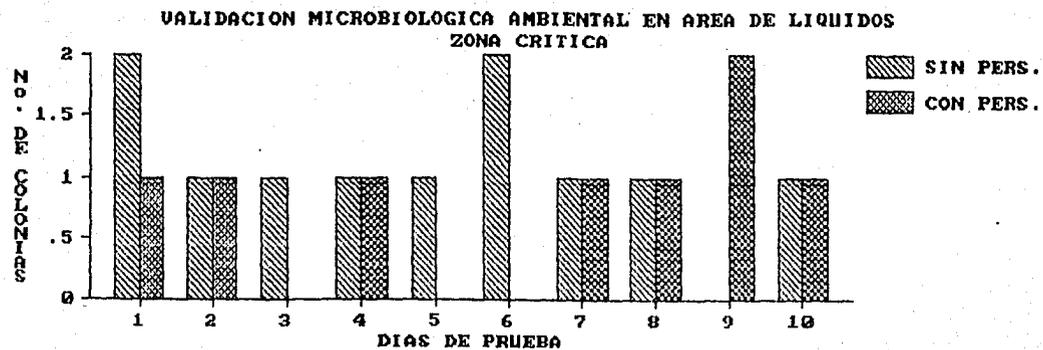
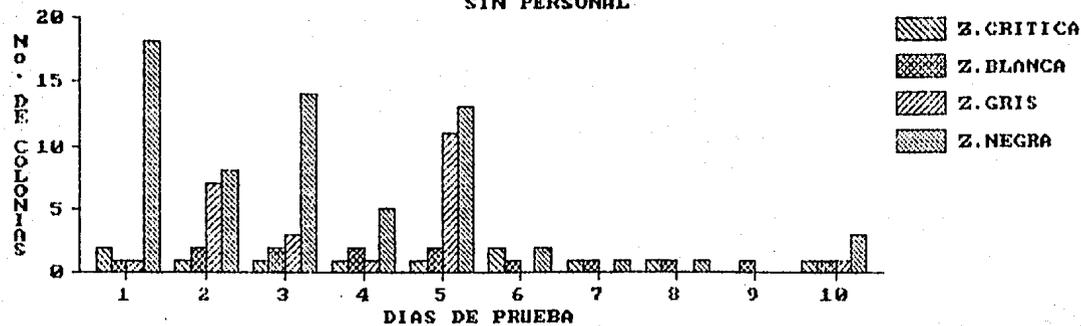


Fig. 5.5

VALIDACION MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL EN AREA DE LIQUIDOS
SIN PERSONAL



CON PERSONAL

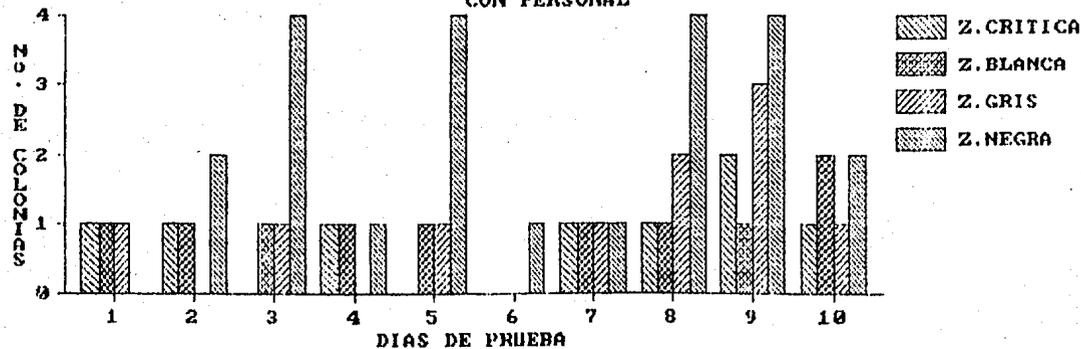


Fig. 5.6

5.5 PRUEBA DE SIMULACION DE PROCESO

Con esta prueba se verifica la efectividad y adaptabilidad de filtración de aire, esterilización de contenedores, esterilidad del equipo, las condiciones ambientales y prácticas de manufactura.

CONDICIONES:

- Las condiciones ambientales deberá ser idénticas a las normales de trabajo.
- Uniforme apropiado para área controlada.
- Todo el material empleado deberá ser estéril.
- Las pruebas se realizaron en las dos secciones de llenado de antibióticos (polvos) y soluciones.
- La prueba se realizó en dos ocasiones con un mes de diferencia entre ellas.

MATERIAL EMPLEADO:

- Medio de cultivo digerido de caseína soya (TSG).
- Medio de cultivo tioglicolato (NIH).
- Agua destilada.
- Frasco ampula, tapon y sello.
- Ampolletas.
- Equipo de sellado, llenado y engargolado.
- Incubadoras a 20 y 35 grados centígrados.
- Horno y autoclave.
- Equipo de microfiltración.

PROCEDIMIENTO:

- Se llenaron 500 contenedores en las mismas condiciones de velocidad, volúmen y personal que en el llenado de un lote de producto normal con medio de TSG y 500 contenedores con medio de NIH, procediendo al cerrado y sellado de cada uno de ellos.

- Posteriormente los contenedores con TSG se incubaron a 20 grados centígrados y los de tioglicolato a 35 por un lapso de 5 días. Finalmente se observó si hubo desarrollo microbiano.
- Se llenaron 500 contenedores con agua destilada que fueron utilizados para realizar las pruebas de esterilidad, toxicidad y pirógenos.

RESULTADOS:

Los resultados de la prueba de simulación de proceso se reporta en los cuadros 5.IX y 5.X.

Cuadro 5.IX RESULTADOS DE LA PRIMERA PRUEBA DE SIMULACION DE PROCESO

Area de Prueba	Esterilidad		Pirogenos	Toxicidad	Nivel de Contaminación
	TSG	NIH			
Antibióticos (polvos)	1	-	-	-	0.06 %
Líquidos fco. ampula	1	-	-	-	0.06 %
Ampolletas No. 1	1	-	-	-	0.07 %
Ampolletas No. 2	-	1	-	-	0.07 %

Para Antibióticos (polvos) y líquidos, como no se dañaron contenedores, el nivel de contaminación es:

$$\text{Nivel de contaminación} = \frac{1}{1500 - 0} \times 100 = 0.06 \%$$

En el llenado de ampolletas se dañaron 120 ampolletas, por lo tanto el nivel de contaminación es:

$$\text{Nivel de contaminación} = \frac{1}{1500 - 120} \times 100 = 0.07 \%$$

Cuadro 5.X RESULTADOS DE LA SEGUNDA PRUEBA DE SIMULACION DE PROCESO

Area de Prueba	Esterilidad		Piro- genos	Toxi- cidad	Nivel de Contaminación
	TSG	NIH			
Antibióticos (polvos)	-	-	-	-	0
Líquidos fco. ampula	1	-	-	-	0.06 %
Ampolletas No. 1	-	-	-	-	0
Ampolletas No. 2	-	-	-	-	0

En el llenado de líquidos no se dañaron contenedores, por lo tanto el nivel de contaminación es:

$$\text{Nivel de contaminación} = \frac{1}{1500 - 0} \times 100 = 0.06 \%$$

Cuadro 5.XI RESUMEN DE RESULTADOS DEL MONITOREO MICROBIOLÓGICO DE LAS AREAS ANTIBIÓTICOS (POLVOS) Y LÍQUIDOS

ELEMENTO	RESULTADOS	PRUEBAS EFECTUADAS
Filtros HEPA	0 Col./3min.	Exposición de cajas en entradas de aire.
Luz UV	6.0 - 8.5 microwatts/cm ²	Lecturas de la intensidad de radiación.
Autoclave	120.5-123 C Satisfactorios	Distribución de temp. Testigos físico y biológico.
Horno	200-208 C Satisfactorios	Distribución de temp. Testigos físico y biológico.
Superficies	0 Colonias	Prueba de Swabs.
Ambiente en: zona crítica	1 colonia max.	Exposición de cajas por 30 min.
zona blanca	2 colonias max.	
Equipo de Llenado y Personal	Nivel de contaminación 0 - 0.07 %	Prueba de simulación de proceso.

ANALISIS DE RESULTADOS

Al obtener los resultados satisfactorios para los sistemas de esterilización de: filtros HEPA, luz UV, autoclave, horno y evaluación de superficies que muestra la tabla 5.XI se continúa con el programa de validación ambiental microbiológico.

En las gráficas de resultados obtenidos en la validación ambiental se puede observar claramente como el número de microorganismos encontrados en las secciones de llenado de antibióticos (polvos) y líquidos compuestas de sus respectivas zonas crítica, blanca, gris y negra va disminuyendo conforme los controles para la prevención de la contaminación aumentan, esto es, que la zona negra que es una parte en la que no cuenta con luz UV, además que el personal entra con ropa de calle llevando un halo de contaminación aumentando la cuenta de microorganismos respecto a las otras.

Otro punto que se puede observar al comparar los resultados de las dos fases de la validación con y sin personal, es que la contaminación es ligeramente más alta los primeros días de la prueba en la primera fase y esto se puede atribuir a que el área se estuvo limpiando, así que la contaminación encontrada es el resultado de los últimos días de la purga de los sistemas esterilizantes.

Una vez que se asegura que el ambiente es adecuado para el llenado de productos estériles se procede a la prueba de simulación de proceso, en la que se evaluó además de los sistemas de esterilización, el equipo de llenado y el personal que interviene en el proceso obteniéndose un nivel de contaminación satisfactorio para la empresa.

Los valores obtenidos en esta validación serán considerados para validaciones posteriores exclusivamente para la empresa en la que se llevó a cabo dicha validación, de tal forma que si se encontrara alguna desviación, se estudiarán los sistemas que se han estudiado, para determinar la causa que origine tal desviación.

Después de analizar los resultados de la validación se recomienda seguir un programa de validación periódicamente, específico para cada sistema como se muestra en el cuadro 5.XII.

Cuadro 5.XII PROGRAMA DE VALIDACION DEL AREA CONTROLADA

SISTEMA	TIPO DE PRUEBA	FRECUENCIA
Filtros HEPA	Reto con DOP Microbiológica	Cada 6 Meses Semanalmente
Luz UV	Medición de Int. de Lámparas	Cada 3 Meses
Horno y Autoclave	Distribución de Temp. Testigos Físicos y Biológicos	Cada 6 Meses
Ambiente	Microbiológica	Diariamente
Superficies	Microbiológica	Semanalmente
Equipo de Llenado	Prueba de Simulación de Proceso	Cada 6 Meses

CONCLUSIONES

Al elaborar éste trabajo tuvimos la oportunidad de comprobar lo importante que es para el Químico Farmacéutico Biólogo, el tener conocimiento a cerca del diseño y la construcción de un área controlada en condiciones óptimas para la elaboración de productos estériles, ya que su función es primordial por ser él quien exige resultados de la funcionalidad del lugar de trabajo. Así es que, es muy importante conocer las opciones que existen en cuanto a materiales y las ventajas que presentan cada uno de ellos para los fines que se pretenden en el acabado final.

Se dependió básicamente de las disposiciones de la empresa en la que se construyó el área y se puede asegurar que fué bien estudiado el proyecto de diseño y construcción, en el que se consideró muy a conciencia todos los detalles y requisitos exigidos en la Buenas Prácticas de Manufactura y la Secretaría de Salud. El papel más importante que desempeñamos en éste proyecto fué principalmente la de comprobar que el área es realmente funcional, es decir, desarrollar y realizar un método de validación así como el proporcionar un programa para validaciones posteriores.

Durante la investigación para el desarrollo de ésta tesis encontramos varios métodos para efectuar la validación de los sistemas que ayudan a evitar la contaminación en el área controlada, de los cuales la mayoría de éstos métodos son reportados en la literatura oficial, mientras que otros son recomendados por casas proveedoras que aseguran resultados satisfactorios. Los métodos utilizados en la parte experimental de la validación del área controlada son oficialmente reportados en la U.S.P., B.P. y C.F.R. con excepción del método utilizado para la evaluación U.V. en la que se empleó el recomendado por la casa proveedora mismo que ha sido estudiado en otra literatura no oficial demostrando su efectividad.

Al no contar con todo el equipo necesario se tuvo que hacer algunas modificaciones en los siguientes métodos:

- En la evaluación del sistema de aire, por no contar con muestreador de aire, se muestreó directamente de las entradas de aire filtrado por un tiempo determinado para realizar la evaluación microbiológica.
- En la evaluación del método de esterilización por calor seco (horno) se realizaron pruebas de esterilidad en frasco vacío, muestreando de los diferentes niveles del horno y considerando el resultado como el de un testigo biológico.

Estas modificaciones dieron resultados que consideramos confiables, de ahí que podemos concluir que si no se contara con el equipo adecuado y sugerido en las técnicas oficiales se puede adaptar o crear otro método que permita obtener resultados de evaluación.

Al obtener los resultados ya analizados de la validación ambiental y de los sistemas del área controlada se concluye que:

- El diseño y el acabado del área, cumple con las especificaciones requeridas por las Buenas Prácticas de Manufactura y de la Secretaría de Salud a la vez que se adapta a las necesidades de la empresa.
- Al obtener un medio ambiental adecuado dentro del área controlada y niveles de asepsia satisfactorios, se asegura un alto grado de calidad de los productos estériles que allí se fabriquen.
- Estos primeros datos serán un antecedente para validaciones retrospectivas o reevaluaciones y sirven para la elaboración de un programa de validación y la frecuencia con la que se debe efectuar.

La validación es un conjunto de evaluaciones documentadas que permiten comprobar la efectividad de los procesos involucrados en la fabricación de un producto, teniendo como resultado final la calidad de dicho producto. Por medio de estas evaluaciones podemos determinar las variables que se deben controlar para evitar desviaciones posteriores del proceso.

Finalmente podemos asegurar que los objetivos fijados al inicio de esta tesis se cumplieron satisfactoriamente, además que durante su desarrollo adquirimos experiencias que ayudarán a mejorar el criterio de nuestra vida profesional.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Curriel Benito David, Manual de Adiestramiento para Personal no Calificado que Labora en Area Estéril.
- 2 Sharp John. Esterile Area Design. Manufacturing Chemist. 53 (9); 47-49. (1982).
- 3 Lachman L., Lieberman H. A. and Kaning J. L. The theory and Practice of Industrial Pharmacy 2nd Edition. Lea and Febiger, Philadelphia; 567-625. (1976).
- 4 Helman Jose. Farmacotecnia Teórica y Práctica. Cia. Editoral Continental, S.A. de C.V., México. (1982).
- 5 U. S. Federal Standard Specification No. 209 B. Clean Room and Work Station Requieriments Controlled Environment General Service Administration. (1973).
- 6 Kladko M. Fundamentals of Clean Rooms. Pharm. Technol. Conf.; 239-246. (1981).
- 7 Wearly Marlys, B.B. Utilization of the Limulus and Amebocyte Lysate Test for Pirogen Testing Learge Volume Parenterals, Administration Sets and Medical Devices. Bull Parents Drug Assoc. 31 (3); 127-135. (1977).
- 8 Berger R.T. Four Mitestore to Successful Parenteral Facility Design. Pharm. Tecnol. 7 (10); 56-59. (1983).
- 9 Luna Ramos J. Proyecto y Diseño de una Area Estéril. Tesis Profesional UNAM. México, D.F. (1974).
- 10 Remington's. Pharmaceutical Sciences. Fourteenth Ed. Mack Pub. Co. Chapter 36; 505-509. (1970).
- 11 Kelly, P.C. Facility for Small Volumen Parenteral Manufacturing Bull, Parents, Drug, Assoc. 30 (2); 72-79. (1975).
- 12 Griffin, J.C. Design Concepts for a Sterile Products. Production Facility. Bull Parents Drug Assoc. 30 (6); 293-298. (1976).
- 13 Smith, D. T. A Modern Approach to the Design and Construction of Clean Room for Farmaceutical Operation. The Chemical Engen. No. 380; 182-184. (1982).
- 14 Code of Federal Regulations Food and Drugs U.S. Goubernment Printing Office Washingtons 21 Parts 200-299 : 80-89. (1981).

- 15 Fry E.M. And FDA Update on GMP's for Aseptic Processing. J. Parenteral Sci. Tech. 39 (4); 154-157. (1985).
- 16 Frieben W. R. The Effect of Cleanroom Design and Manufacturing Systems on the Microbiological Contamination of Aseptically Filled Products. Pharm Mfg. 2 (11); 13-17. (1985).
- 17 Cipriano F. E., A. P. Process Validation Begins with Initial Plant Desing. Pharmaceutical Engineering; 34-37. (1982).
- 18 Schraemli J. Impianti di Deumidificazione Nell'industria Farmaceutica. Boll, Chim, Farm. 112; 498-505. (1973).
- 19 Anisfeld Milto, K.L. Design for a Small Volume Parenteral Manufacturing Facility. J. Parenteral Drug Assoc. 32 (6); 285-290. (1978).
- 20 U. S. Air Force Technical Order 00-25-203 Standard and Functional Criteria for Design and Operation of Clean Room, Appendix 1 March. (1961).
- 21 Marchall Space Flight Center Standard No. 246. Design and Operation Criteria of Controlled Environment Aress, Standard for Section L. Office of Technical Services, Department of Commerce Washington D.C. July. (1963).
- 22 Jawets E. Melnick J. Manual de Microbiología Médica 4a Ed. Editorial Manual Moderno, S. A. México. (1970).
- 23 B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood. Tratado de Microbiología. Salvat Editores, S.A.; 342-360 . (1975).
- 24 Abshire R. L. The Development of a Biological Indicator for Validation Ultraviolet Radiation Sterilization of Polyethylene Bottles. J. Parenteral Sci. Technol.; 191-197. (1983).
- 25 Pelczar Michael J. Jr., Roger D. Reid. Microbiología. Libros Mc Graw-Hill. (1966).
- 26 AKers M.J., I.A., K.A. Understanding and Utilizing Fo Values.
- 27 United States Pharmacopeia XXI. United States Pharmacopeia Convention Inc. 1321-1351. (1984).
- 28 British Pharmacopeia. London Her Majesty's Stationery Office Appendix XIV K 153 vol. II. (1986).
- 29 Myers R.B. Practical System for Validating Heat Sterilization Processes. J. Parenteral Drug Assoc. 32 (5); 216-225. (1978).

- 30 Litsky W. Ed. B.M. Miller. Industrial Microbiology Edit. Mc Grow-Hill. New York Cap. 14.
- 31 Eudailey, W.A. Membrane Filters and Membrane-Filtration Processes for Health Care. AM. J. Hosp. Pharm. 40 (11); 1921-1923. (1983).
- 32 Wallausser, K.H. Germ-Free Filtration. J. Pharmacie Belgique. 32 (5); 463-467. (1977).
- 33 Good C.M., H.L. The Biochemistry of Pyrogens. Bull Parents. Drug Assoc. 31 (3); 116-120. (1977).
- 34 Lawrence C. A. y Block S. S. Eds. Desinfection, Sterilization and Preservation. Lea and Febiger, Philadelphia. (1968).
- 35 German, A. Le Mode D'action des Agents Antimicrobiens. J. Pharmacie Belgique. 32 (5); 422-432. (1977).
- 36 Rogriguez Devisa Dario, Amalia Navarro Medina. Control de Calidad Durante la Fabricación de Productos Farmacéuticos y Cosméticos. Ed. Castilla, S.A., Madrid.; 208-213. (1976).
- 37 Luna, C.J. Introducing People into the Clean Room. Pharm. Engin. 6 (1); 15-19. (1986).
- 38 Cárdenas Gutiérrez J. M. Curso de Control Ambiental y Validación de Area Estéril. Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C. México, D. F. (1986).
- 39 Gardner R. Y. Current Concepts for the Microbiological Control of Nonsterile Products. A report from PMA Quality Control and Biologics Section. Pharm. Technol. 7 (6); 54-57. (1983).
- 40 Alpering G. Validation Considerations in Pharmaceutical Process and Plant Design. Pharm Enginefring. 4 (3); 15-19. (1984).
- 41 Berry Ira R. Process Validation. A U.S. viewpoint, Mfg. Chem. 54 (1); 34-35. (1983).
- 42 Coming Clean Through Environment Control. Mfg. Chemist. Aer News. 48 (8); 19-22. (1977).
- 43 Grosio R. I. Testing of Laminar Flow Equipment. Parenteral Drug Assoc. 32 (4); 174-181. (1978).
- 44 Mc Quillen, D.F., E.R. Squibb. Design and Testing of Pharmaceutical Sterile Rooms. Pharm. Tech. Conferences. 226-238. (1981).

- 45 Aslund B. Et Al. Testing of Laminar Air Flow Units by Particle Counting and by Microbial Methods. Act. Pharm Suecica. 13 (5-6); 469-474. (1976).
- 46 Dell, L. A. Aspects of Microbiological Monitoring for Nonsterile and Sterile Manufacturing Environments. Pharmaceutical Technology. 3 (8); 47-51. (1979).
- 47 Dony J., M. J. Devlees Chouwer. Evaluation de L'efficacite des Désinfectants Epreuves Préliminaires en Vitro. J. Pharmacie Belgecue. 33 (2); 120-125. (1978).
- 48 Seyforth, H. Determination of Microbiological Quality of Air in the Production of Sterile Preparations. Drugs Made in Germany. 24 (2); 48-52. (1981).
- 49 Validation of aseptic Filling for Solution Drug Products. Parenteral Drug Association, Inc. Technical Monograph No. 2. ISSN 0196-3619. (1980).