

40  
Def



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

VALIDACION DE PROCESOS DE ESTERILIZACION  
Y DESPIROGENIZACION

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**J. JESUS RODARTE SALCEDO**



MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



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.

## CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
A. Validación de Procesos.....	3
1. DEFINICION.....	3
2. RAZONES PARA VALIDAR.....	3
a. Legales.....	3
b. Sanitarias.....	4
c. Económicas.....	4
3. TIPOS DE VALIDACIONES.....	6
a. Prospectiva.....	6
1) Definición.....	6
2) Organización.....	6
3) Documentación.....	7
4) Fases en las que Interviene el Programa de Validación.....	8
a) Desarrollo del Producto.....	8
b) Desarrollo de la Capacidad Productiva..	8
c) Desarrollo del Proceso y Producto	
a Gran Escala.....	9
d) Definición de Programas Experimentales.	9
e) Diseño Experimental y Análisis.....	10
b. Retrospectiva.....	10
1) Definición.....	10
2) Selección de Criterios del Producto.....	11

3) Selección y Evaluación de Datos	
Históricos.....	12
4. ORGANIZACION.....	13
a. Estructuras.....	13
1) El Contratista.....	13
2) La fuerza de Trabajo.....	13
3) El Grupo Dedicado.....	14
b. Departamentos Responsables.....	15
1) Producción.....	15
2) Aseguramiento de Calidad.....	15
3) Ingeniería.....	16
4) Investigación y Desarrollo.....	16
B. Validación de Productos Estériles.....	16
1. ESTERILIZACION.....	16
a. Cinética de Muerte Microbiana.....	18
1) Modelo Matemático.....	13
2) Valor D.....	19
3) Valor z.....	22
4) Valor F.....	22
b. Equipos Empleados para Esterilizar.....	26
1) Desplazamiento de Gravedad.....	26
2) Ciclo de Prevacio.....	27
3) Ciclo por Pulsación.....	27
4) Mezclas de Vapor y Aire para Parenterales	
de Gran Volumen.....	27
2. DESPIROGENIZACION.....	28
a. Metodología para la Prueba de Pirógenos.....	29

1) In vivo.....	29
2) In vitro.....	29
b. Cinética de Destrucción de Endotoxina.....	30
c. Equipos Empleados para Despirogenizar.....	33
1) Esterilizador en Lote por Convección Forzada.....	33
2) Esterilizador en Tunel por Convección Forzada.....	34
3) Esterilizador en Tunel por Infrarrojo.....	35
4) Esterilizador de Flama.....	35
II. OBJETIVOS.....	36
III. HIPOTESIS.....	37
IV. METODOLOGIA.....	38
A. Proceso de Despirogenización de Ampolletas.....	38
1. CALIBRACION DE TERMOPARES.....	38
a. Material y Equipo.....	38
b. Procedimiento.....	38
2. DISTRIBUCION DE CALOR.....	40
a. Material.....	40
b. Procedimiento.....	41
3. INOCULACION DE ENDOTOXINA EN AMPOLLETAS.....	44
a. Material y Equipo.....	44
b. Procedimiento.....	45
4. PENETRACION DE CALOR Y DESAFIO CON ESPORAS Y ENDOTOXINA.....	45
a. Material y Equipo.....	45
b. Procedimiento.....	46

5.	PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (PIROGENOS).....	48
6.	DETERMINACIÓN DE ESPORAS TERMORRESISTENTES.....	49
B.	Proceso de Esterilización Final de Inyectables.....	50
1.	CALIBRACIÓN DE TERMOPARES.....	50
2.	DISTRIBUCIÓN DE CALOR.....	50
a.	Material y Equipo.....	50
b.	Procedimiento.....	51
3.	PENETRACIÓN DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO.....	51
4.	DETERMINACIÓN DE ESPORAS TERMORRESISTENTES.....	54
5.	REQUISITOS GENERALES PARA LA CALIFICACIÓN.....	54
C.	Esterilización de Material de Microbiología.....	55
1.	CALIBRACIÓN DE TERMOPARES.....	55
2.	ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN DE CALOR.....	55
3.	PENETRACIÓN DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO.....	58
V.	RESULTADOS.....	59
A.	Proceso de Despirogenización de Ampollitas.....	59
1.	DISTRIBUCIÓN DE CALOR EN CÁMARA VACIA.....	59
2.	DISTRIBUCIÓN DE CALOR CON CARRO Y CHAPOLAS VACIAS.....	59
3.	DISTRIBUCIÓN DE CALOR EN CARGA MINIMA.....	60
4.	PENETRACIÓN DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO.....	60
5.	PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS.....	62
6.	DETERMINACIÓN DE ESPORAS TERMORRESISTENTES.....	64
7.	VALOR F MINIMO.....	64
B.	Proceso de Esterilización Final de Inyectables.....	64
1.	CALIBRACIÓN DE TERMOPARES.....	64
2.	DISTRIBUCIÓN DE CALOR.....	65

3. PENETRACIÓN DE CALOR.....	65
4. VALOR F MINIMO.....	66
5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	66
C. Proceso de Esterilización de Material	
de Microbiología: Ciclo de Gravedad.....	69
1. CERTIFICACIÓN DE TERMOPARES.....	69
2. DISTRIBUCIÓN DE CALOR.....	69
3. PENETRACIÓN DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO.....	69
4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	72
D. Proceso de Esterilización de Material	
de Microbiología: Ciclo de Líquidos.....	72
1. CERTIFICACIÓN DE TERMOPARES.....	72
2. DISTRIBUCIÓN DE CALOR.....	72
3. PENETRACIÓN DE CALOR.....	73
4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	78
VI. DISCUSION DE RESULTADOS.....	79
A. Despirogenización de Ampolletas.....	79
B. Proceso de Esterilización Final de Inyectables.....	82
C. Esterilización de Material de Microbiología:	
Ciclo de Gravedad.....	83
D. Esterilización de Material de Microbiología:	
Ciclo de Líquidos.....	84
VII. CONCLUSIONES.....	87
VIII. SUGERENCIAS.....	89
IX. REFERENCIAS.....	90
X. BIBLIOGRAFIA.....	93

## INTRODUCCION

Un proceso de manufactura validado es aquel que ha sido probado y documentado, y cumple lo que se propone o representa. La prueba de la validación se obtiene a través de la colección y evaluación de datos, preferentemente al inicio de la fase de desarrollo y continuando en la fase de producción. La validación de procesos incluye la calificación del proceso (materiales, equipos, sistemas, instalaciones y personal), pero también considera el control del proceso completo para lotes o procesos repetidos [1,2].

La validación para productos parenterales tiene tres objetivos fundamentales: producir la esterilidad dentro del producto, demostrar con un nivel máximo de probabilidad que el proceso y métodos de esterilización han establecido esterilidad a todas las unidades de un lote de producción y proveer mayor seguridad y dar soporte a los resultados de la prueba de esterilidad en el producto terminado [3].

El objetivo fué efectuar la validación de los procesos de esterilización y despirogenización de ampollitas vacías, y esterilización final de inyectables, empleados por el departamento de producción y los procesos de esterilización de material de microbiología, relacionando la temperatura alcanzada por los artículos con la letalidad microbiana y la inactivación

de endotoxina.

La validación en el presente trabajo, incluye únicamente la calificación de la efectividad operacional, siendo esta la última fase de la validación, en sentido estricto.

La metodología empleada para la validación ha sido sugerida por instituciones prestigiadas dentro de la rama farmacéutica como la Asociación de Fabricantes de Medicamentos Parenterales (PDA), y por expertos de la industria (4,5,6).

Es necesario mencionar que los objetivos de este trabajo son puramente académicos y no se deben considerar para fines regulatorios por carecer de la documentación original, condición estricta para validar los procesos; misma que se encuentra en Janssen Farmacéutica, S.A. de C.V., empresa que patrocinó los estudios.

## I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

### A. Validacion de Procesos

#### 1. DEFINICION

Programa documentado que provee un alto grado de seguridad de que los procesos empleados en la industria farmacéutica operan en rangos preestablecidos, de manera reproducible, para obtener productos con los atributos y especificaciones de calidad predeterminados como son: seguridad, potencia, pureza y efectividad (7).

#### 2. RAZONES PARA VALIDAR

##### a. Legales

El Proyecto de Norma Técnica que Establece las Guías Generales de Validación, indica en los artículos 1 - 4 que las normas de validación son de observancia pública e interés social (7).

La validación de procesos está implicada como un requisito que se desprende de la Ley General de Salud, su Reglamento y de las Prácticas Adecuadas de Manufactura vigentes para productos farmacéuticos (7).

b. Sanitarias

La validación de procesos es la única manera de asegurar la calidad de un producto. Los principios básicos de aseguramiento de calidad tienen como meta la producción de artículos para el uso planeado. Estos principios se establecen como sigue:

La calidad, seguridad y efectividad deben diseñarse y construirse en el producto.

La calidad no puede ser inspeccionada o analizada únicamente en el producto terminado; cada paso en del proceso de manufactura debe ser controlado para tener la máxima probabilidad de que el producto cumpla con todas las especificaciones de calidad y diseño.

La validación del procesos equivale a certificar al paciente que se administrará un producto seguro y que cumplirá el objetivo para el que fué diseñado (3).

c. Económicas

El establecimiento de controles propios del proceso reduce el número de lotes rechazados y de procesos, muestreos y análisis repetidos.

Es posible reducir costos de producción como resultado de la optimización de procesos, al usar controles apropiados que no son arbitrarios.

Reducción del tiempo de proceso, al eliminar los factores de seguridad empleados en los sistemas no validados.

La reducción del tiempo de proceso evita gastos innecesarios, al operar cerca de la capacidad máxima, ya que se establecen los límites del proceso óptimos.

Reducción de pruebas en proceso y producto terminado.

Incrementa la eficiencia operativa general de la planta.

Cuando la validación de procesos ha sido adoptada como un objetivo de la corporación, se obtienen los siguientes beneficios: Evita accidentes que se difunden rápidamente a través de los medios masivos de comunicación, como el ocurrido en marzo de 1971 en los Estados Unidos en el que 150 pacientes sufrieron de septicemia y otros 9 murieron como consecuencia de la administración intravenosa de suero contaminado por bacilos *Erwinia* y *E. cloacae*, y concluyó al retirar del mercado 103,700 botellas de suero, prohibición de la producción de suero por Abbott Laboratories hasta que se corrigió el problema, y la disminución de ventas por el desprestigio al hacerse público el accidente (8).

La validación puede proteger los productos en el mercado. Un retiro o problemas serios con el producto en un país, puede resultar en retirados en otros países (2).

La validación puede asegurar estándares altos de uniformidad en la calidad en todas las operaciones.

A través de la validación, los aspectos de calidad de los productos pueden asegurarse más fácilmente, y la exportación se hace más sencilla.

### 3. TIPOS DE VALIDACIONES

#### a. Prospectiva

##### 1) Definición

Documentación de la validación obtenida antes de que el proceso sea operacional.

##### 2) Organización

La validación prospectiva requiere un programa planeado y una organización necesaria para llevar a cabo el proceso completo. La organización debe definir claramente las áreas de responsabilidad y autoridad. La estructura debe ajustarse para cumplir los requisitos en una organización específica, y ésta

varia de una compañía a otra. El punto importante es el que define la estructura existente, que este aceptada y sea operativa.

La estructura gerencial tendrá las funciones de planear, ejecutar y controlar el programa.

Sin responsabilidades definidas claramente, puede haber partes de la validación prospectiva que no se realicen. Contrariamente puede ocurrir que dos o mas individuos o grupos, asuman la responsabilidad unilateralmente, resultando en una duplicidad de esfuerzos, pérdida de tiempo y dinero [1].

Los problemas como los mencionados, solamente pueden ser minimizados mediante una adecuada planeación organizacional [1].

### 3) Documentación

Un programa de validación prospectiva debe estar soportado en una documentación extensiva a partir del inicio de la producción a gran escala. El paquete de documentación puede referirse como "Archivo Maestro de Documentación". Este se acumulará como un progreso en el concepto del producto al punto de ponerse a producción a gran escala, obteniendo una historia del producto tan completa como sea posible. El paquete final será el trabajo de muchos individuos. Consiste en reportes, procedimientos, protocolos, especificaciones, métodos analíticos y

otros documentos críticos pertenecientes a la formulación y proceso.

El paquete puede contener los reportes actuales, o puede utilizar referencias cruzadas a la documentación formal e internos y externos a la organización (1).

#### 4. Fases en las que Interviene el Programa de Validación

La validación no es un proceso aislado. Es una porción integral de la secuencia de desarrollo del producto y proceso completos, que incluye las siguientes fases:

##### a) Desarrollo del Producto

Inicia cuando una entidad química ha mostrado que posee los atributos necesarios para su comercialización. Las actividades de desarrollo del producto para la entidad química activa, formulación y proceso forman la fundación bajo la cual los datos de la validación subsecuente serán construidos (1).

##### b) Desarrollo de la Capacidad Productiva

Deben existir las instalaciones de producción adecuadas para cada proceso de manufactura. Estas instalaciones incluyen edificios, equipo, departamentos de apoyo, y funciones de soporte. Se realiza paralelamente a la capacidad de manufactura

del producto. El objetivo y el tiempo de desarrollo de la capacidad productiva sera dependiente del proceso y la necesidad de utilizar o modificar las instalaciones existentes o establecer nuevas (9).

#### c) Desarrollo del Proceso y Producto a Gran Escala

El desarrollo del proceso de producción a gran escala final, procede a través de los siguientes pasos: estudios de escalamiento del proceso, pruebas y calificación de procesos.

#### d) Definición de Programas Experimentales

El objetivo de esta parte es examinar los experimentos o combinaciones de experimentos que realizarán los programas de desarrollo. El énfasis estará en las técnicas para incrementar la efectividad del programa de desarrollo.

Una metodología lógica y sistemática para cada situación es esencial. Cualquier experimento que se realice sin definición previa de la metodología lógica es fuente de pérdidas. Un balance estricto entre sobreplaneación y subplaneación siempre debe estimarse. Generalmente es imposible definir un experimento sustancial al inicio, y ejecutarlo con todo detalle sin sufrir modificaciones; para disminuir esto, es necesario elaborar compartimientos del programa.

### 3) Ingeniería

Las funciones que tiene son: escalamiento de nuevos productos y procesos, manufactura de productos para propósitos clínicos y mantenimiento de la planta.

### 4) Investigación y Desarrollo

Se involucra debido a la optimización, escalamiento y validación de nuevos productos y procesos [11].

## B. Validación de Productos Esteriles

### 1. ESTERILIZACION

Los productos estériles poseen varias propiedades como forma farmacéutica única, tales como: libres de microorganismos, a-pirogénicos y libres de partículas, y patrones extremadamente altos de calidad; sin embargo, el punto álgido en la manufactura de productos estériles es la ausencia absoluta de contaminación microbiana [3].

Contraria a las especificaciones de muchas formas farmacéuticas, la esterilidad es un valor absoluto. Un producto puede ser estéril o no-estéril. Históricamente, la evaluación de esterilidad se basa en la prueba de esterilidad en producto terminado; sin embargo, sufre de una gran cantidad de limitacio-

nes. La más importante es la naturaleza de la misma, es una prueba destructiva; por lo tanto depende de la selección estadística de una muestra al azar del lote completo. la incertidumbre puede existir si la muestra no representa la totali - dad. Si se conociera que una unidad tomada de mil unidades estuviera contaminada (i.e., grado de contaminación de 0.1% y 20 unidades fueran muestreadas al azar, la probabilidad de que una unidad estuviera incluida en esas 1000 unidades es de 0.02% [5].

Aun si una unidad contaminada estuviera presente en las 20 muestras, existe la posibilidad de que la prueba de esterilidad fallara en detectar la contaminación. El contaminante microbiano puede estar en concentración demasiado baja para ser detectable durante el periodo de incubación o no crecer debido a insuficiencias nutricionales del medio de cultivo y tiempo y temperatura inadecuados de incubación.

Si se detecta crecimiento microbiano en una prueba de esterilidad, este puede reflejar lectura falsa-positiva por el problema de contaminación accidental del medio de cultivo cuando se realiza la prueba [3].

En 1983 la FDA publicó los lineamientos pertenecientes a los principios generales de validación de procesos. Un punto se enfatizó: la insuficiencia de la prueba de esterilidad como forma única de liberación de un lote de producto parenteral.

Se debe poner mayor interés en la validación de procesos [3]. Las mayores limitaciones demostraron que la liberación de un producto terminado estéril basado en la prueba de esterilidad puede resultar erróneo. Un objetivo en la validación de productos estériles es minimizar la dependencia de la prueba en producto terminado. Los principios que se involucran en la validación de procesos para productos estériles son:

Construir la esterilidad dentro del producto.

Mostrar con un cierto nivel máximo de probabilidad que el proceso y métodos de esterilización proveen esterilidad a todas las unidades del lote de producción.

Proveer mayor seguridad y dar soporte a los resultados de la prueba de esterilidad a producto terminado.

#### a. Cinética de Muerte Microbiana

##### 1) Modelo Matemático

Se considera la muerte microbiana, y más específicamente la inactivación de esporas, como una reacción monomolecular consistente en una reacción de primer orden; esto es, la velocidad de reacción está gobernada por la concentración de los reactantes (esporas). Matemáticamente se expresa como:

$$-dC/dt = KC \quad (1)$$

Donde  $t$  es el tiempo,  $C$  es la concentración de esporas,  $K$  es la velocidad de reacción y  $-dC/dt$  es la velocidad en que decrece la concentración de esporas.

Integrando la ecuación anterior entre límites de concentración  $C$ ,  $C_0$ , tiempo  $t$  y  $t_0$ , obtenemos:

$$\ln (C_0/C) = K (t - t_0), \quad t_0 = 0 \quad (2)$$

por lo tanto  $\ln (C_0/C) = K t$ , transformando a logaritmo en base 10 obtenemos:

$$2.303 \log (C_0/C) = K t \quad (3)$$

Una curva semilogarítmica de concentración vs. tiempo muestra una línea recta con pendiente  $K$  representada en la gráfica 1

## 2) Valor D

El valor  $D$  está definido como el tiempo requerido para reducir la población microbiana en 90% o un ciclo logarítmico en condiciones específicas de exposición.

La pendiente de la curva de supervivencia puede expresarse como:

$$(\log C_0 - \log C)/D = 1/D \quad (4)$$

Sustituyendo en la ecuación de la línea recta  $y = mx$  (5)

se obtiene:  $\log a - \log b = t/D$  (6)

rearraglando  $t = D(\log a - \log b) = D \log (a/b)$  (7)

Comparando las ecuaciones (3) y (7), tenemos

$$D = 2.303/K \quad (8)$$

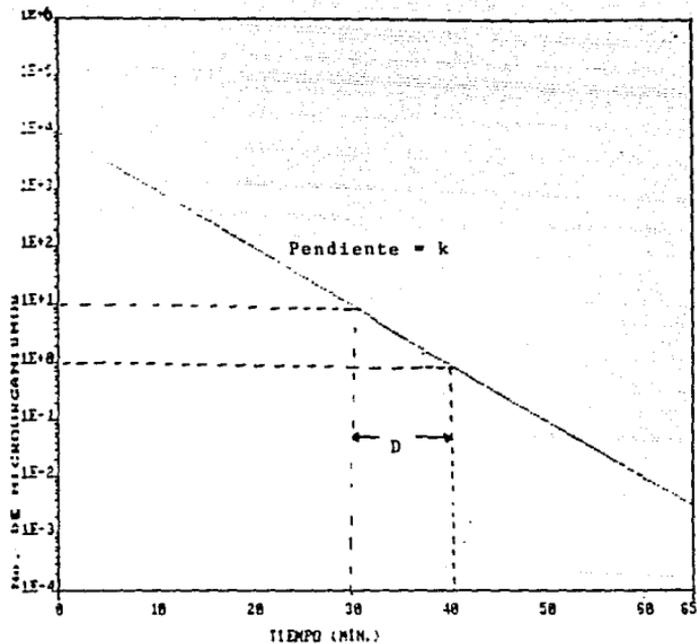
ya que tanto K como D representan la pendiente de la curva de supervivencia.

Muchos microorganismos muestran curvas de supervivencia no-lineales como la siguiente:

$$D = \frac{1}{\log C_0} - \frac{[1 - \alpha t - (\alpha \beta e^{-t/\beta - 1})]}{\log C_t} \quad (9)$$

La causa de las curvas de supervivencia no lineales ha sido explicada por varias teorías, como la teoría de los sitios múltiples y heterogeneidad de la resistencia de esporas al calor.

El valor D es el término mas conveniente para comparar la resistencia de diferentes microorganismos a algún agente letal.



GRAFICA 1. Velocidad de destrucción microbiana a temperatura constante: valor D

### 3. Valor z

El valor Z se define como la temperatura requerida para reducir en una unidad logarítmica el valor D. Al graficar la temperatura vs. D, se obtiene la pendiente z (Gráfica 2).

$$Z = (\log D_2 - \log D_1)/z = 1/z \quad (10)$$

El valor z permite calcular y evaluar los procesos de esterilización dependientes del calor, si se emplean diferentes temperaturas en todo el proceso, ya que diferentes especies y cepas varían su resistencia relativa a diferentes temperaturas y a agentes químicos en fase vapor aplicados a diferentes temperaturas.

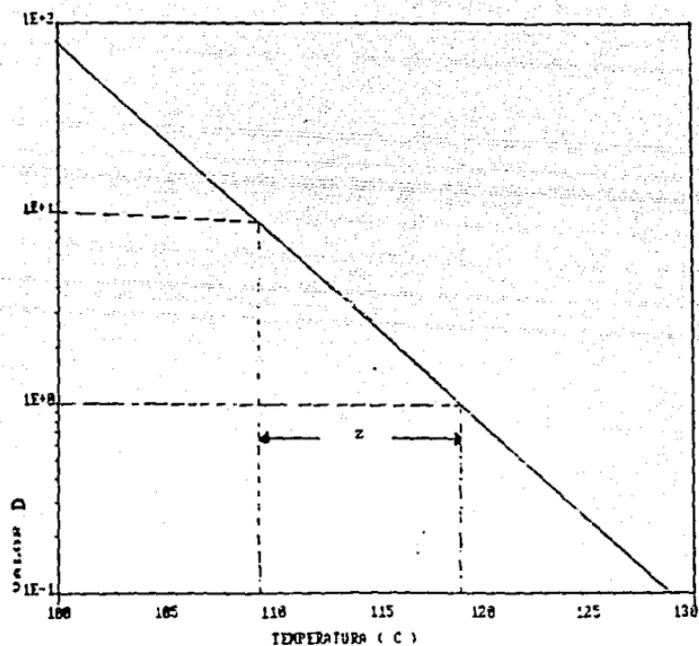
### 4) Valor F

El valor F es la integración de las velocidades de destrucción en un proceso térmico.

Del gráfico (2) se obtiene la ecuación:

$$\log D_2 - \log D_1 = (1/z)(T_1 - T_2) \quad (11)$$

Introduciendo el valor F como tiempo en modificar el valor D en un diferencial, tenemos:



GRAFICA 2. Efecto de la temperatura en el valor D: valor z

$$\log F_1 - \log F_2 = (1/z) (T_1 - T_2) \quad (12)$$

donde  $F_1$  = tiempo a una temperatura de referencia  $T_1$

$F_2$  = tiempo que causa el mismo grado de destrucción a otra temperatura

$$T_1 = 0$$

$$\log F = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (13)$$

$$F = 10^{[(T_1 - T_2)/z]} \quad (14)$$

Considerando el intervalo de un minuto en la curva de destrucción, haciendo

$$L = 10^{[(T - T_0)/z]} \quad (15)$$

$L$  = letalidad constante integrada entre límites de tiempo  $t_1$  y  $t_2$ .

$$F = \int_{t_1}^{t_2} L dt \quad (16)$$

Los datos de temperatura durante todo el ciclo a intervalos continuos (e.g. cada minuto) deben estar disponibles como un prerrequisito para la evaluación analítica del proceso de esterilización mediante calor. Ya que los datos están disponibles, el valor  $F$  del proceso de esterilización puede determi-

narse sin importar la carga de la cámara.

Convencionalmente lo que interesa es el valor de esterilización en la zona de calentamiento mas baja del contenedor, i.e., la zona en la que el contenedor recibe el valor F más bajo, llamada comunmente punto frio (3).

Las temperaturas deben medirse a intervalos de tiempo cortos, de tal forma que se tenga una visión clara del calentamiento como del enfriamiento. La frecuencia en la que deben hacerse las mediciones tiempo-temperatura depende de la velocidad del calentamiento del producto, que asimismo es función del tamaño de la carga y la viscosidad del producto en el contenedor (para el caso de líquidos). Probablemente un mínimo de 20 datos son necesarios para describir adecuadamente el perfil de calentamiento y enfriamiento y calcular el valor F del proceso de esterilización.

Los métodos para calcular el valor F de la gráfica obtenida son los empleados en matemáticas para conocer el area bajo la curva y son:

Integración indefinida. Para aplicar esta técnica es necesario conocer la función de la curva.

Regla trapecial. Es un método de aproximación en el que se divide la función del valor F en segmentos iguales y se determi

nan las áreas de los trapecios formados.

Regla de Simpson. Es un método más aproximado que la regla trapezoidal ya que los puntos sucesivos en la gráfica de  $F = f(L)$  son conectados por líneas rectas y en la regla de Simpson son conectados por parábolas.

#### b. Equipos Empleados para Esterilizar

El método de elección para esterilizar es mediante vapor bajo presión, excepto para productos que no son penetrados adecuadamente por el vapor o donde el calor y la humedad dañan el producto, en este caso se utiliza proceso aséptico, radiación, o empleando óxido de etileno [4].

##### 1) Desplazamiento por Gravedad

Está basado en el principio de que el aire frío dentro de la cámara es más pesado que el vapor que entra. La densidad del aire a  $20^{\circ}\text{C}$  es alrededor de  $1.2 \text{ g/l}$ ; y la del vapor a  $100^{\circ}\text{C}$  es  $0.6 \text{ g/l}$ . Cuando el vapor entra a la cámara el aire es empujado al fondo del drenaje y sale con el condensado a través de una trampa termostática o bomba de vacío. La efectividad de la eliminación del aire de la cámara se observa midiendo la temperatura en la línea de drenado [4].

El aire gravitará al área más baja de la cámara, disminuyendo

la temperatura en la línea de drenaje. Cuando el aire es eliminado será reemplazado por vapor saturado puro [4].

### 2) Ciclo de Prevacio

Un método más efectivo consiste en remover el aire atrapado mecánicamente antes de que la esterilización comience. Se realiza mediante una bomba de vacío.

### 3) Ciclo por Pulsación

Debido a la dificultad de obtener condiciones drásticas de vacío para remover el aire, se diseñaron estos ciclos en base a pulsadores de vapor alternados, seguidos de excursiones de vacío. Las presiones máximas y mínimas son variables.

### 4) Mezclas de Vapor y Aire para Parenterales de Gran Volumen

Aunque el aire se considera un problema ya que reduce la eficiencia de la esterilización por vapor, en ocasiones su presencia es requerida.

Las soluciones acuosas de parenterales son comúnmente esterilizadas en autoclaves de vapor, en este caso la función más importante de condensar vapor está provista por una transferencia de calor rápida a las paredes del producto, estos pueden ser llenados en contenedores flexibles o rígidos.

Cuando la solución se calienta, el gas se expande a una velocidad mayor que el volumen equivalente de vapor; por lo tanto, la presión del contenedor excederá la presión de la cámara.

Los viales de vidrio pueden sellarse con cierres especiales para liberar esta presión. Las bolsas de plástico o contenedores semirígidos presentan un gran problema, ya que no tienen la dureza inherente al vidrio, pueden abrirse o presentar deformidades cuando se presentan incrementos diferenciales de presión.

## 2. DESPIROGENIZACION

En el proceso de despirogenización el objetivo es inactivar los remanentes de las bacterias gramnegativas. Estos organismos se encuentran comunmente en el agua y sus paredes celulares contienen endotoxinas que son capaces de inducir desde una respuesta febril, hasta shock y muerte cuando se encuentran en fluido cerebro-espinal. Aunque estas respuestas son de gran interés para la industria farmacéutica, no todos los efectos causados por las endotoxinas son peligrosos. La porción mayor de la cadena polisacárida es el antígeno O, la región responsable de la inmunidad a las infecciones por bacterias gramnegativas. La porción lipídica A es la responsable del resto de los efectos biológicos de las endotoxinas: inducen la producción de factores que son citotóxicos a los tumo-

res. otras protegen contra los efectos de la radiación. Muchos de estos efectos, incluyendo la respuesta febril, resultan de la alteración del metabolismo de la sangre y células tisulares. Las endotoxinas inducen a los macrófagos para producir los factores que influyen otros factores celulares como los que causan la coagulación de la sangre, hipotensión y fiebre. Los efectos biológicos específicos y su intensidad dependen de la fuente bacteriana de endotoxina, su solubilidad en los fluidos biológicos y la presencia o ausencia de sustancias asociadas (e.g. otros componentes de la pared celular) (12).

#### a. Metodología para la Prueba de Pirogenos

##### 1) *In vivo*

La prueba consiste en inyectar el producto en la vena de la oreja del conejo, y registrar la temperatura corporal durante tres horas después de la inyección y observar si hay incremento de temperatura (máximo 0.8 C).

##### 2) *In vitro*

Este método ha demostrado ser mas sensitivo actualmente disponible para la detección de endotoxinas.

Es un procedimiento que utiliza lisado preparado de los amebos

cidos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*).

La prueba es simple, específica, rápida y relativamente barata, comparada con la prueba de pirógenos *in vivo*.

La prueba de *Limulus* consiste en la combinación de una cantidad de lisado de amebocitos con la solución muestra, incubación a 37°C por un periodo específico de tiempo, y la verificación de la muestra para evidenciar coagulación. El punto final positivo es indicado por la formación de un gel sólido, un punto de turbidez o un punto colorimétrico. La prueba se lee por examinación visual del gel o por técnicas espectrofotométricas.

La cuantificación se puede llevar a cabo por comparación del punto final con un control positivo de concentración conocida de endotoxina.

#### b. Cinética de Destrucción de Endotoxina

Durante muchos años, los pirógenos fueron descritos por sus fenómenos fisiológicos sin considerar el conocimiento real de su estructura química o mecanismo de acción; por lo tanto, los pirógenos fueron descritos únicamente como entidades responsables de la inducción febril (13,14).

Los pirógenos predominantes son ahora conocidos como lipopolí

sacáridos (LPS) provenientes de la pared celular externa de los microorganismos gramnegativos [13,14].

El calor seco ha sido usado tradicionalmente como un medio de despirogenizar vidrio, equipo, instrumentos, materiales termoequ coastables, etc. Los conocimientos de destrucción de LPS se iniciaron con los trabajos de Tsuji y colaboradores [13,14]. La carencia de la información se debía al gran número de animales requeridos para la prueba de pirógenos de la USP, que hace imprácticos los estudios de cinética de destrucción de endotoxina.

El desarrollo del método *in vitro* para la detección sensible de LPS por medio de amebocitos lisados de *Limulus* (LAL) hizo posible conducir los estudios de cinética de destrucción.

Los microorganismos que sometieron a estudio el equipo de Tsuji fueron: *S. paracens.*, *S. typhosa*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *B. thermotrans.*

Sometieron los LPS de estos microorganismos a diferentes temperaturas (160 - 200 C) y tiempos (1 - 3 h), las conclusiones a las que llegaron fueron las siguientes:

La velocidad de destrucción es independiente de la concentración de LPS.

La destrucción por calor seco de LPS fué no lineal cuando se graficó en papel semilogaritmico.

Los lipopolisacáridos representan una clase de compuestos de significado biológico con características drásticas de resistencia al calor seco.

La cinética de destrucción es de segundo orden.

La ecuación que permite evaluar la inactivación de ciclo es:

$$F = \Delta t \Sigma 10^{[(T - T_{ref})/z]}$$

de donde:

F = inactivación alcanzada por el ciclo en términos de endotoxina

$\Delta t$  = diferencial del tiempo. para fines prácticos se utiliza un minuto

T = temperatura registrada

$T_{ref}$  = temperatura de referencia, por convencionalismo es 170°C

z = temperatura requerida para reducir una unidad logaritmica el valor D

### c. Equipos Empleados para Despirogenizar

La industria farmacéutica emplea típicamente los hornos de calor seco y túneles para esterilizar y/o despirogenizar una gran variedad de materiales empleados en la manufactura de productos parenterales. Las características del calor seco lo hacen el método de elección para despirogenizar los componentes de empaque de vidrio por su capacidad de destruir pirógenos, debido a las altas temperaturas alcanzadas (180-300°C). Los equipos usados para este tipo de proceso pueden variar de los remarcadamente simples, a los muy complejos. Una estufa por convección de gravedad consiste únicamente de una caja con fuente de calor, y un termostato; un túnel usado para despirogenización de ampollitas y viales en producción puede contar con sistemas de control computarizados muy sofisticados para monitorar y mantener las temperaturas, flujos de aire, presiones relativas, y otros parámetros.

Los tipos de esterilizadores/despirogenizadores son: horno por convección forzada, en túnel por convección forzada, in-frarrojo y a la flama continuo (5).

#### 1) Esterilizador en Lote por Convección Forzada

Es el tipo de esterilizador por calor seco mas usado en la industria. La unidad utiliza los principios de transferencia de calor convectiva para calentar los componentes. Los esterili-

zadores pueden emplear un rango de ciclos (mediante la variación de tiempos y temperaturas) para utensilios, material de vidrio, equipo de acero inoxidable y producto. Los artículos son preparados en una area controlada no-estéril (empleando controles como acceso limitado, niveles de partículas reducidos, calidad de aire conocido, empleo de cofias, etc.).

Los artículos son colocados sobre charolas e introducidos en la cámara. El diseño de los ciclos dependerá del objetivo de esterilizar y/o despirogenizar. Convencionalmente hay una fase de enfriamiento al terminar el ciclo de calentamiento que sirve para minimizar el choque térmico de los componentes e incrementar la seguridad en el manejo.

En la mayoría de las instalaciones se emplea un horno de doble puerta y la carga es removida del horno en el area aséptica.

## 2) Esterilizador en Tunel por Conveccion Forzada

Opera continuamente y tiene la capacidad de procesar una mayor cantidad de viales de vidrio y ampollitas, que la del esterilizador en lote. Las botellas, viales o ampollitas son lavadas en el area no-estéril y transportadas a través del túnel donde se encuentra aire a diferentes temperaturas. El material de vidrio se calienta en la porción inicial y media del túnel, y se enfria gradualmente mediante filtros de alta

eficiencia (HEPA), antes de salir de la terminación estéril. Los túneles por convección forzada son calentados por resistencias eléctricas y emplean los mismos principios que los hornos en lote [5].

#### 3) Esterilizador en Túnel por Infrarrojo

Está equipado con una fuente de radiación infrarroja, ya sea por resistencia o tubo de cuarzo. Tiene sensores de temperatura para controlar el calentamiento y están localizados en la zona de esterilización. El calentamiento y el tiempo de exposición pueden ser afectados por la geometría, color, superficie y composición del artículo a tratarse, así como también de la temperatura y velocidad del aire [5].

#### 4) Esterilizador de Flama

Utiliza la transferencia de calor por conducción y convección en el proceso de ampollitas. Puede procesar arriba de 10,000 ampollitas por hora. Las ampollitas son colocadas en un riel, lavadas con agua para inyectables, transportadas y calentadas durante un minuto aproximadamente. Pasan entonces a la cámara de enfriamiento donde son enfriadas gradualmente por aire filtrado HEPA. Las ampollitas frías se llenan y sellan. El esterilizador de flama posee una serie de deflectores en la cámara de esterilización para incrementar la uniformidad en el calentamiento [5].

## II. OBJETIVOS

1. Relacionar la temperatura aplicada a los artículos para esterilizar, con la letalidad microbiana e inactivación de endotoxina en los ciclos de esterilización y despirogenización.
2. Calificar los procesos en base a los factores físicos y microbiológicos predeterminados.
3. Determinar si los procesos aseguran esterilidad, en concordancia con los conceptos de validación (protocolo); para liberarlos en producción rutinaria o aplicar las acciones correctivas necesarias y efectuar una revalidación.

### III. HIPOTESIS

El factor mas importante en el proceso de esterilización mediante calor, es la temperatura alcanzada por los articulos durante el tiempo de exposicion.

La verificacion de las caracteristicas del abastecimiento del calor a cada tipo y tamafio de carga en los procesos especificos, permitira evaluar la letalidad de los ciclos en terminos microbiologicos.

#### IV. METODOLOGIA

La metodología se realizó de acuerdo al protocolo de validación aprobado por la corporación, el diagrama 1 permite visualizar la secuencia experimental de manera general.

##### A. Proceso de Despirogenización de Ampolletas

##### 1. CALIBRACION DE TERMOPARES

##### a. Materiales y equipo

10 termopares tipo "T" (cobre-constantano)

Termómetro de referencia estándar (NBS certificado)

escala 155-305° C con divisiones de 0.5° C y escala auxiliar a 0° C

Baño de glicerina (180° C)

Baño de hielo (0° C)

Registrador de temperaturas multipunto KAYE DIGISTRIP<sup>MR</sup>

##### b. Procedimiento

Colocar los termopares en el registrador de temperaturas teniendo una escala de graduaciones no mayor a 0.1° C, prender el registrador y permitir el tiempo adecuado para estabilizar los componentes (≈ 5 minutos).



Calibrar los termopares a  $0^{\circ}\text{C}$  y  $180^{\circ}\text{C}$  contra el termómetro estándar de referencia. La lectura debe estar entre  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  con el termómetro de referencia.

Realizar un total de 5 lecturas, cada una a intervalos de un minuto.

Los termopares que no estén acordes con el termómetro de referencia no deben utilizarse en los estudios y se retiran.

Verificar la calibración antes y después de cada proceso de la validación; la calibración posterior al proceso del ciclo se considera como la calibración inicial del próximo ciclo.

Registrar todos los datos de calibración de termopares.

## 2. DISTRIBUCIÓN DE CALOR

### a. Material

Horno VECO<sup>MR</sup> de  $1.5\text{m}^3$  de capacidad

Carro para colocar charolas de acero inoxidable

56 charolas para colocar ampolletas

16 termopares tipo "T"

Registrador de temperaturas KAYE DIGISTRIP<sup>MR</sup>

b. Procedimiento

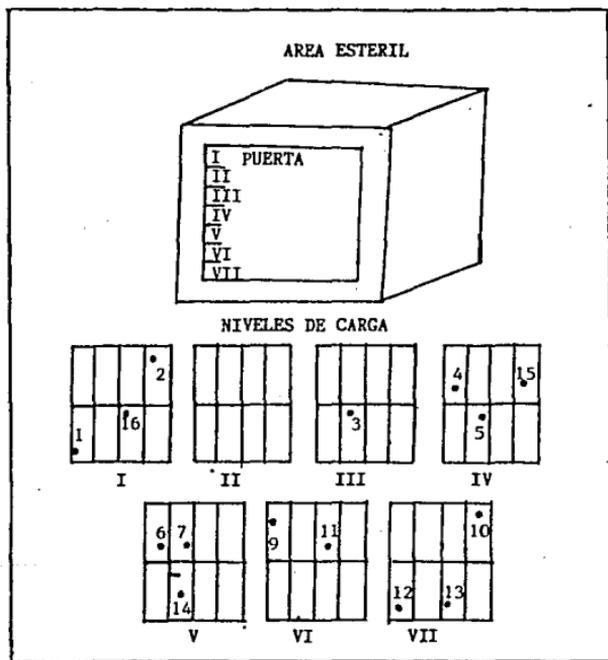
Los estudios de distribución de calor se realizan con la cámara vacía, cámara con charolas vacías y horno cargado con producto en el patrón de carga mínimo, para determinar la presencia y localización de puntos fríos.

Suspender 7 termopares homogéneamente en la cámara, uno donde se encuentra el centro de la cámara y seis alrededor de las puertas, ya que son los puntos con mayor probabilidad de recibir menor calor, siguiendo el diagrama 2, procesar el ciclo y efectuar las lecturas de temperatura cada minuto en el registrador.

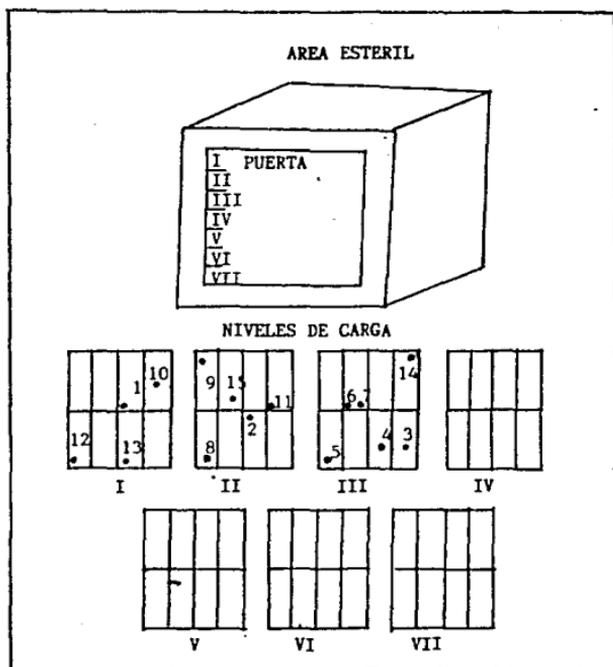
Verificar los datos de temperaturas en horno, tanto en cámara vacía, como en cámara conteniendo el carro con charolas vacías, para determinar los puntos fríos del equipo.

Los puntos fríos son posiciones que muestran consistentemente temperaturas bajas, o que presentan la temperatura especificada, pero no el tiempo.

Efectuar tres procesos adicionales en la cámara conteniendo la carga mínima de ampollitas (7000) lavadas según se indica en el procedimiento de manufactura, colocando los termopares en los puntos fríos determinados previamente, de acuerdo al diagrama 3.



**DIAGRAMA 2:** Distribución de termopares para estudio térmico preliminar en el horno cargado con charolas vacías.



**DIAGRAMA 3:** Localización de termopares para estudio de distribución de calor con carga mínima.

Verificar si los datos de los puntos fríos corresponden a los establecidos en los estudios anteriores, para emplearse en los estudios de penetración y reto microbiológico (esporas y endotoxina).

### 3. INOCULACION DE ENDOTOXINA EN AMPOLLETAS

#### a. Material y equipo

Pipetas graduadas de 1.5 y 10 ml

Tubos de ensayo 10 x 75mm

Agua para inyectables

Guantes de latex

Perilla de hule

Cofia y cubrebocas

Gradilla

Endotoxina E. Coli de referencia hidratada lote 7L0010

Lisado de amebocitos de *Limulus* reconstituido

Ampolletas de 10 ml abiertas

Papel aluminio

Campana de flujo laminar horizontal

Baño ultrasónico Mallinkrodt

Agitador vortex

Termómetro calibrado 0 - 45°C

Estufa para incubación (37°C ± 0.5°C)

#### b. Procedimiento

Preparar los indicadores de endotoxina en condiciones asepticas (i.e., en campana de flujo laminar, con cofia, cubrebocas y guantes de latex estériles). Todos los materiales deben estar esterilizados y despirogenizados siempre y cuando tengan contacto con reactivos y ampollitas en su interior [11].

Inocular las ampollitas con endotoxina en concentración 1000 veces mayor que el limite de detección, la sensibilidad de la prueba de *Limulus* es 0.250 UE (unidades de endotoxina).

Efectuar las diluciones a dosificar y hacer los ajustes necesarios para obtener la concentración de 250 UE/ml.

Tapar con papel aluminio la boca de las ampollitas y distribuir la endotoxina en las paredes de la ampollitas y dejar secar a 60°C durante 12 horas.

#### 4. PENETRACION DE CALOR Y DESAFIO CON ESPORAS Y ENDOTOXINA

##### a. Material y Equipo

Horno VECO<sup>MR</sup>

Registrador de temperaturas KAYE DIGISTRIP<sup>MR</sup>

16,128 ampollitas de 10ml vacias

16 termopares

10 tiras de *B. subtilis* var. *niger* certificadas TECSIQUIM<sup>MR</sup>

ATCC 9372 lote 488 TC

10 ampollitas inoculadas con endotoxina *E. coli*

b. Procedimiento

Colocar los bioindicadores de *B. subtilis* adyacentes a las ampollitas conteniendo endotoxina *E. coli*, en los puntos fríos localizados en los estudios de distribución de calor.

Insertar 10 termopares en las ampollitas conteniendo endotoxina, de acuerdo al diagrama 4.

Efectuar el proceso, registrar la temperatura cada minuto y retirar los bioindicadores y el reto de endotoxina para efectuar la prueba de crecimiento microbiano y la prueba de endotoxinas bacterianas (pirógenos) con reactivo de *Limulus*.

Realizar el proceso por triplicado, retando al sistema en cada uno de los procesos con bioindicadores y endotoxina.

Determinar el valor F para cada uno de los puntos fríos en las tres corridas, para evaluar la destrucción del ciclo en términos de endotoxina.

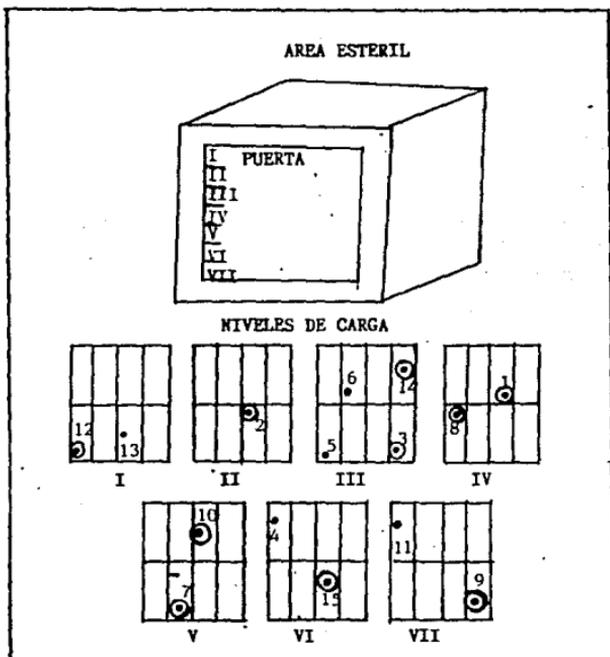


DIAGRAMA 4: Localización de termopares en el estudio de penetración de calor y reto con esporas y endotoxina en 3 ciclos consecutivos con carga máxima.

( ) termopar sin reto

(●) termopar con reto

##### 5. PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (PIROGENOS)

Después de cada proceso de penetración, se recuperan las ampollitas inoculadas con endotoxina y se refrigeran hasta el momento de realizar la prueba por el personal de microbiología. La prueba consiste de los siguientes pasos, de manera general:

La prueba debe efectuarse con técnica aséptica.

Reconstituir el lisado de amebocitos, con agua para inyectables.

Preparar la endotoxina de referencia (base) y disolverla con agua para inyectables.

Diluir la endotoxina a la concentración de 250 UE/ml a partir de la solución base.

Preparar controles negativos con agua para inyectables.

Añadir el reactivo LAL a los controles negativos.

Ajustar el pH de la muestra (6.0 - 7.5).

Adicionar el reactivo de LAL a las muestras.

Preparar los controles positivos con endotoxina de referencia y efectuar la reacción.

Incubar los tubos con control positivo, negativo y muestras a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos.

Evaluar los resultados; presencia de gel: reacción positiva, ausencia de gel: reacción negativa.

#### 6. DETERMINACION DE ESPORAS TERMOPRESISTENTES

Las tiras colectadas después de los estudios de penetración de calor se refrigeran hasta realizar la prueba de promoción de crecimiento por el personal de microbiología. La prueba consiste en los siguientes eventos:

Colocar las tiras bioindicadoras de *B. subtilis* en botellas estériles de 100 ml.

Adicionar a cada botella con las tiras, medio de cultivo caldo caseína soya.

Incubar las botellas a  $30-35^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.

Los tubos con medio de cultivo, sin tira bioindicadora, actúa como control negativo.

Los tubos con medio de cultivo y tira bioindicadora sin haberse sometido al ciclo de esterilización actúan como control positivo.

La evaluación de prueba se realiza mediante la observación de turbidez indicando presencia de microorganismos, y la ausencia de turbidez indica ausencia de microorganismos.

## B. Proceso de Esterilización Final de Inyectables

### 1. CALIBRACION DE TERMOPAPES

La calibración se realiza como se indicó en página 38 a 0°C y 121°C.

### 2. DISTRIBUCION DE CALOR

#### a. Material y Equipo

Autoclave FEDEGARI<sup>MR</sup>

Carro para colocar charolas de acero inoxidable

22,000 ampolletas de 10 ml llenas con agua

48 charolas para colocar ampolletas

16 termopares tipo "T" (cobre-constantano)

Registrador de temperaturas KAYE DIGISTRIP<sup>MR</sup>

b. Procedimiento

Los estudios de distribución de calor se realizan en cámara vacía, en cámara con charolas vacías y en carga mínima por triplicado, para evaluar la reproducibilidad en el mantenimiento del calor.

Colocar los termopares en los puntos fríos o más difíciles de la carga, de acuerdo al diagrama 5, preestablecido.

Efectuar la corrida de los ciclos a 121°C durante 30 minutos.

Registrar las temperaturas cada minuto.

3. PENETRACION DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO

Colocar los termopares en los puntos fríos localizados en los estudios de distribución de calor, siguiendo el diagrama 6.

Colocar un indicador biológico de *B. stearothermophilus* ATCC 7953 lote 1387 de TECSIQUIM<sup>MR</sup> en tiras conteniendo  $10^5$ -  $10^6$  microorganismos, previamente contados en el laboratorio de microbiología.

Los termopares de distribución de calor deben colocarse en forma inclinada, para que no se formen gotas de condensado en

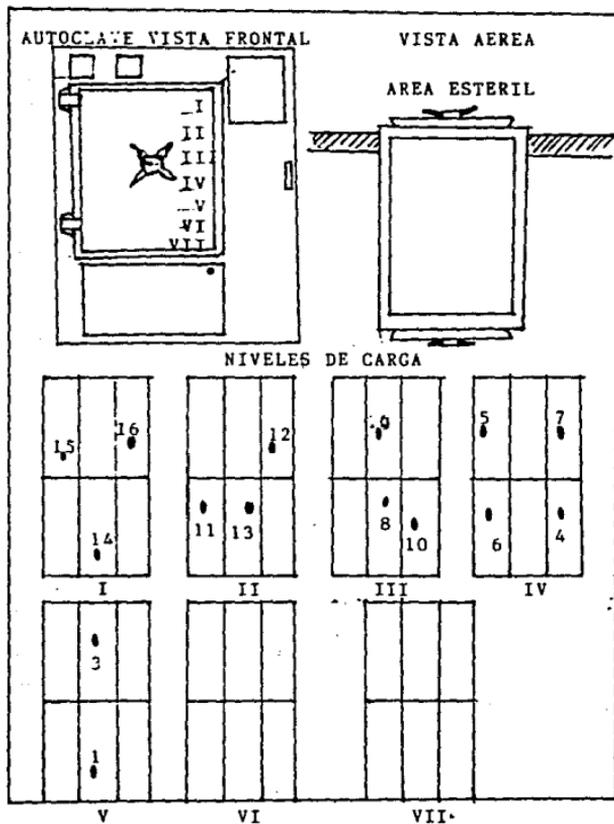


Diagrama 5. Localización de termopares en el estudio de distribución de calor con carga mínima

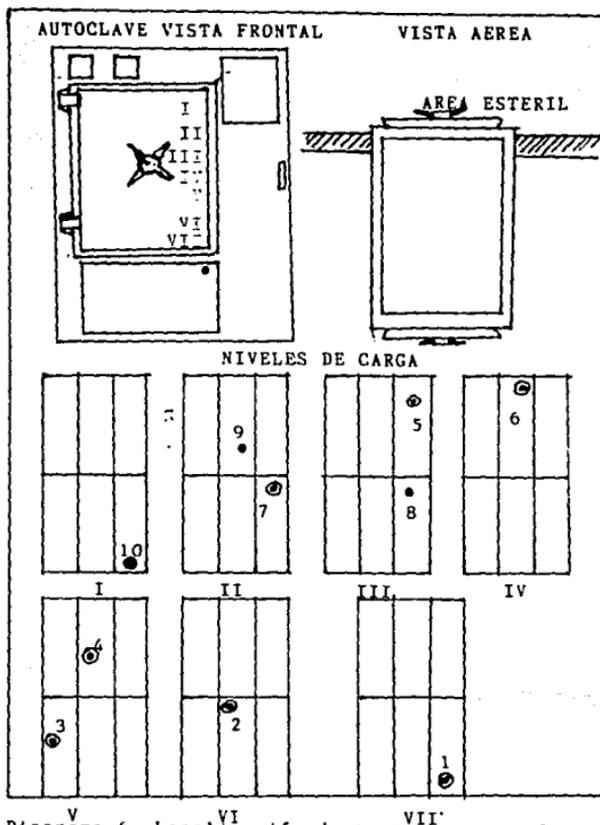


Diagrama 6. Localización de termopares en el estudio

de penetración y reto microbiológico.

1: (D1,P9), 2: (D2,P10), 3: (D3,P11)

4: (D4,P12), 5: (D5,P13), 6: (D6,P14)

7: (D7,P15), 8: (D8), 9: (D9), 10: (P6)

D = Distribución

P = Penetración

Realizar tres ciclos consecutivos en el tiempo de exposición mínimo permitido por la especificación del ciclo que se esté evaluando.

Registrar las temperaturas, la presión y el tiempo de cada ciclo.

Retirar las tiras bioindicadoras después de cada proceso y mantenerlas en refrigeración para realizar posteriormente la prueba de promoción de crecimiento.

Calcular los valores  $F_0$  para cada punto en todos los procesos y evaluar la letalidad de los ciclos.

#### 4. DETERMINACION DE ESPORAS TERMORRESISTENTES

El procedimiento a realizarse es el que se describió en la página 49.

#### 5. REQUISITOS GENERALES PARA LA CALIFICACION

Todos los datos deberán ser reportados en las formas diseñadas para ello por los departamentos de producción y control de calidad.

Para que el proceso se considere validado, se deben cumplir los siguientes requisitos:

Valor  $F_0$  equivalente a 8 minutos o mayor en los puntos fríos determinados en los estudios de distribución y penetración de calor.

La prueba de promoción de crecimiento de *B. stearothermophilus* debe ser negativa.

Contar con registros de temperatura a intervalos de minuto, cuando inician los ciclos, durante el calentamiento y durante el enfriamiento hasta que los termopares indiquen temperaturas abajo de 100°C, y registros de presión.

Los estudios deben cumplir con todos los límites de las especificaciones de los ciclos ( $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y 30 minutos mínimos de exposición).

El tiempo de exposición no debe exceder el tiempo mínimo permitido por la especificación para el estudio de penetración de calor y biovalidación (30 minutos).

Los estudios de distribución de calor, en cada minuto durante la permanencia de exposición, la diferencia máxima no debe exceder un grado centígrado entre los sensores.

Para estudios de distribución de calor ningún sensor individual debe indicar una temperatura abajo de 120°C durante el período de exposición.

Para el estudio de distribución en cámara vacía y cámara con charolas vacías, los datos deben mostrar que la temperatura puede ser controlada dentro de un rango de  $1^{\circ}\text{C}$ .

### C. Esterilización de Material de Microbiología

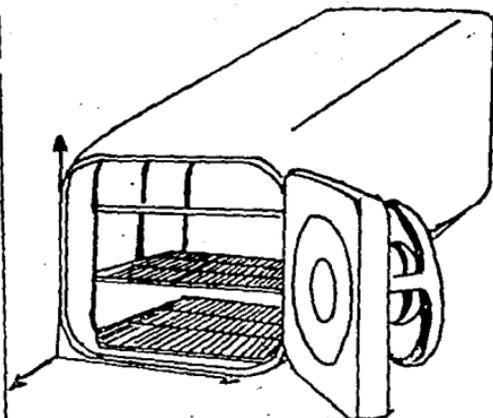
Realizar los siguientes estudios para cada uno de los tipos de ciclos empleados en el laboratorio de microbiología: y que son en el caso de líquidos, para esterilización de medios de cultivo y líquidos, y el de gravedad, en el que después de la fase de vapor sigue la de enfriamiento, es utilizado para esterilizar artículos cubiertos como pipetas, muestreadores, guantes, uniformes, etc.

#### 1. CALIBRACION DE TERMOPARES

La calibración se realiza como se indicó en la página 38 a  $0^{\circ}\text{C}$  y  $121^{\circ}\text{C}$ .

#### 2. ESTUDIO DE DISTRIBUCION DE CALOR

Se requiere un proceso en cámara vacía y otra con cámara con carro charolero, y tres con carga mínima para determinar los puntos fríos, los cuales se retarán con esporas termorresistentes durante los estudios de penetración de calor, con localización de termopares descritos en el diagrama 7.



A	B	C	ESPORA
D1(25,00)	25,0,0	25,0,0	-
D2(25,0,0)	25,0,0	25,0,0	-
D3(45,45,90)	45,35,10	40,35,10	2
D4(5,45,90)	5,35,10	25,6,48	3
D5(40,25,80)	45,15,90	10,6,74	4
D6(30,40,70)	5,35,90	10,6,15	8
D7(15,25,60)	25,35,48	10,35,40	6
D8(45,40,60)	25,25,48	40,8,16	7
D9(25,35,40)	45,10,15	40,35,10	2
D10(15,15,70)	5,10,15	25,6,48	3
D11(30,20,60)	30,40,90	10,6,74	4
D12(10,15,30)	10,15,85	30,8,70	9
D13(20,35,25)	25,10,25	10,35,40	6
D14(40,20,10)	30,5,40	40,8,16	7
D15(10,15,48)	20,5,70	10,6,15	8
D16(25,25,3)	20,35,65	40,35,75	5

Diagrama 7. Localización de termopares en el autoclave de microbiología.

A: Cámara vacía, B: Cámara con carro y charolas vacías, C: Penetración y reto microbiológico

### 3. PENETRACION DE CALOR Y RETO MICROBIOLOGICO

Efectuar dos corridas con carga máxima para evaluar la reproducibilidad, en los puntos frios se colocan tiras certificadas de *B. stearothermophilus*, colocando un termopar adyacente a cada punto frio para determinar los valores  $F_0$ , de acuerdo al diagrama 7.

## V. RESULTADOS

### A. Proceso de Despirogenización de Ampollitas

#### 1. DISTRIBUCION DE CALOR EN CAMARA VACIA

Los puntos fríos localizados fueron los 7, 11 y 13, en el proceso efectuado; indicándonos que la distribución de calor no es homogénea.

Ningún termopar indicó temperaturas menores a  $165^{\circ}\text{C}$  durante el periodo de exposición, estando dentro de especificaciones.

La temperatura mínima fue de  $165.6^{\circ}\text{C}$  y la máxima de  $209.5^{\circ}\text{C}$ , estando dentro de especificaciones (temperatura mínima  $165^{\circ}\text{C}$ )

#### 2. DISTRIBUCION DE CALOR CON CARRO Y CHAROLAS VACIAS

El flujo de calor se modificó al cambiarse la configuración de la carga, los puntos fríos localizados fueron los 7, 9, 10, 11, 12 y 13, manteniéndose los puntos 7, 11 y 13 con respecto al estudio en cámara vacía, por lo que se consideran en los puntos para el reto microbiológico.

### 3. DISTRIBUCION DE CALOR EN CARGA MINIMA

En los tres procesos consecutivos se determinaron los puntos frios 13, 14 y 16, estos no se modificaron.

Las temperaturas mínimas se muestran en la tabla I.

		PUNTO FRIO		
		13	14	16
C O R R I D A	1	179.7	182.1	184.8
	2	182.1	182.6	178.7
	3	174.6	179.9	183.9

Tabla ( I ). Temperaturas mínimas obtenidas durante los estudios de distribución en carga mínima.

### 4. PENETRACION DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO

Las temperaturas promedio se observan en la tabla ( II ), el punto frío consistente en los tres procesos consecutivos fué el número 11, en este punto se omitió el reto microbiológico con esporas y endotoxina; por lo que se realizó un proceso adicional para retar con endotoxina la zona donde se localiza

TERMOPAR	CORRIDA			
	1a	2a	3a	ADICIONAL <sup>1</sup>
1	198.1	199.9	201.9	168.8
2	186.1	189.5	191.5	175.4
3	184.8	187.7	189.0	173.1
4	183.8	181.5	183.4	177.3
5	187.2	188.4	197.1	189.8
6	196.6	197.7	199.1	185.4
7	182.1	178.8	185.8	185.3
8	187.1	184.5	180.0	184.3
9	178.5	180.5	180.0	178.2
10	196.1	197.9	199.3	190.0
11	177.5	163.1	166.5	180.3
12	184.3	184.6	186.6	186.6
13	186.7	189.3	189.3	185.0
14	200.2	204.1	206.3	185.5
15	184.5	180.1	180.6	190.1
16	191.3	196.6	197.6	187.6

<sup>1</sup> Corrida adicional, la distribución de termopares no corresponde a la utilizada en las tres corridas anteriores

Tabla ( II ). Perfil térmico obtenido durante los estudios de distribución y penetración de calor.

el punto 11, de acuerdo al diagrama 8. Las temperaturas obtenidas durante este ciclo se encuentran en la columna 4 de la tabla ( II ).

##### 5. PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

El protocolo de validación indica utilizar un inóculo de endotoxina igual a la sensibilidad del lisado de amebocitos de *Limulus* multiplicado por un factor de 1000.

La sensibilidad la provee el fabricante y se verificó en el laboratorio, siendo ésta de de 0.25 UE/ml, debiendo ser el inóculo de 250 UE/ml, no obstante esto, se inocularon 1400 UE en cada ampollita.

Los indicadores de endotoxina codificados con 1, 2, 8, 9 y 10 presentaron reacción negativa con el reactivo LAL, los demás indicadores mostraron reacción positiva al menos en un proceso; por lo tanto, hay presencia de pirógenos.

Los controles positivos mostraron reacción con el reactivo LAL.

Los controles negativos no mostraron reacción con el reactivo LAL.

En las ampollitas que presentaron reacción positiva, no se

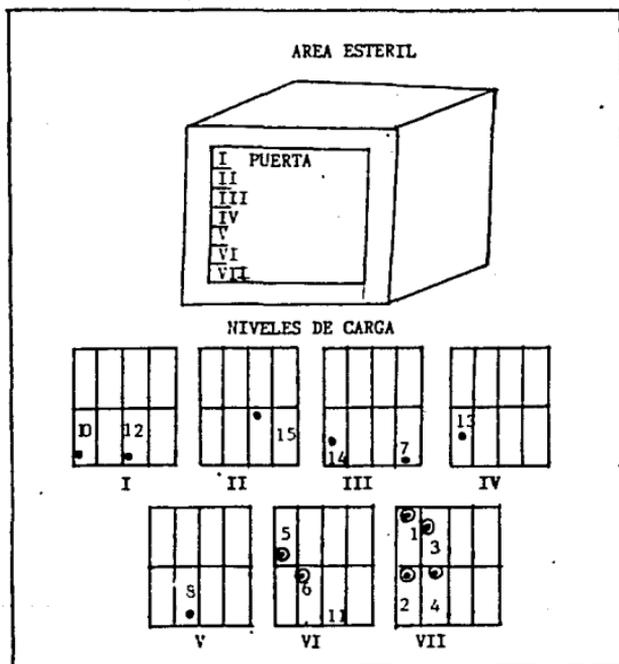


DIAGRAMA: 8 Localización de termopares para evaluación de destrucción de endotoxina en el horno de producción.

cuantificó la cantidad de endotoxina remanente.

El proceso adicional para retar el punto frío 11, indicó presencia de endotoxina después de la exposición en 5 puntos, y en un punto mostró reacción negativa, es decir hubo presencia de endotoxina remanente en las ampollas.

#### 6. DETERMINACION DE ESPORAS TERMORRESISTENTES

Para todas las ampollas inoculadas ( $2.07 \times 10^5$  esporas/tira) se determinó la ausencia de microorganismos, los controles fueron satisfactorios.

#### 7. VALOR F MINIMO

La determinación de los valores F mínimos se realizó con el paquete de computación LOTUS 123, el valor obtenido fue 149 minutos equivalentes a  $170^\circ\text{C}$ , estando fuera de especificación (F mínimo de 600 minutos).

### B. Proceso de Esterilización Final de Inyectables

#### 1. CALIBRACION DE TERMOPARES

Todas las calibraciones satisficieron los requisitos; es decir,  $0.5^\circ\text{C}$  de variación máxima con respecto al termómetro estándar de referencia, en cada uno de los termopares de manera

individual (0°C y 121°C).

## 2. DISTRIBUCION DE CALOR

Para los estudios de distribución de calor, en cada minuto durante la permanencia a 121°C la diferencia máxima entre termopares no excedió 1°C, el calentamiento fué homogéneo en toda la cámara.

La diferencia máxima de temperatura por ciclo y por termopar en las tres corridas consecutivas con carga mínima fué en ambos de 0.7°C.

Se calcularon los valores F para cada sensor. Es importante mencionar que el valor F solo se debe calcular para los termopares colocados adyacentes a las ampollitas con reto microbiológico, se calculó el valor F para efectos de comparación.

El valor F mínimo obtenido fué de 33 minutos equivalentes a 121°C y las variaciones  $\Delta F$  fueron de 3 minutos entre termopares por ciclo y de 7 minutos comparando todos los ciclos.

## 3. PENETRACION DE CALOR

Los valores F calculados para comparar las temperaturas de los sensores de penetración indicaron variaciones  $\Delta F$  de 3 minutos y para un mismo termopar en las tres corridas consecuti-

vas fué de 2 minutos.

El valor F mínimo fue 35 minutos y el máximo de 41 minutos equivalentes a 121°C (ver gráfica 3).

Se graficaron las temperaturas obtenidas por un termopar de distribución y uno de penetración para comparar las variaciones de temperatura permaneciendo el termopar fuera y dentro de la ampollita, y se observó una buena correlación, considerándose para fines prácticos que las temperaturas de distribución equivalen a las de penetración (ver gráfico 4).

#### 4. VALOR F MINIMO

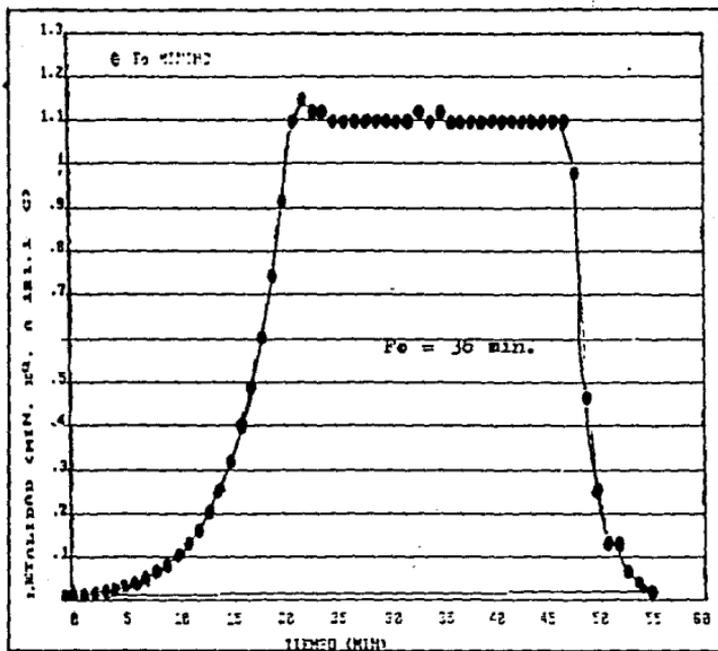
El cálculo se realizó mediante el método de integración por la regla trapezoidal, aplicando la fórmula:

$$F = \int L dt$$

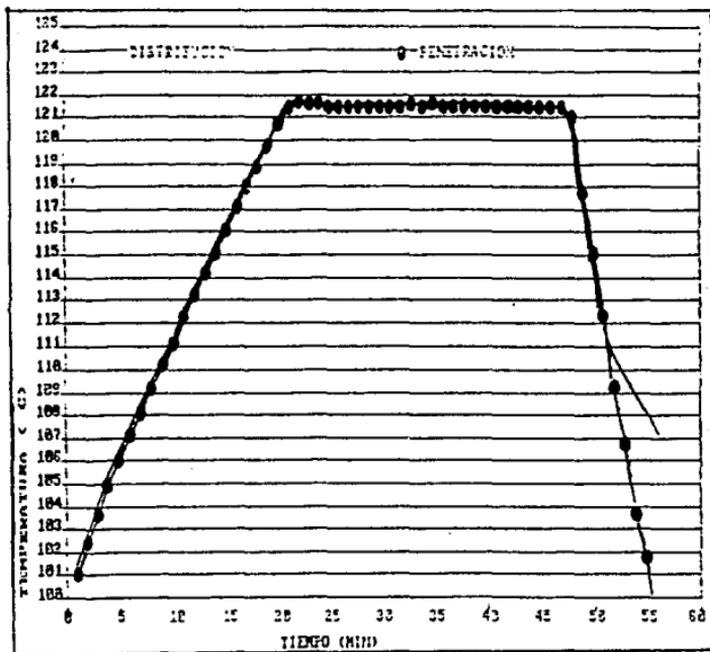
La integración de la curva provee el valor F, como lo muestra la gráfica 3.

#### 5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Ninguno de los retos microbiológicos colocados en las ampollitas presentó crecimiento después de un periodo de incubación de 7 días a 55°C.



Gráfica 3. Representación del valor F mínimo obtenido durante la validación del proceso de esterilización de ampollas.



Gráfica 4. Correlación de temperaturas de distribución y penetración en el autoclave de producción

### C. Proceso de Esterilización de Material de Microbiología:

#### Ciclo de Gravedad

##### 1. CERTIFICACION DE TERMOPARES

Las certificaciones fueron satisfactorias, ningún termopar mostró diferencias mayores a  $0.5^{\circ}\text{C}$  con respecto al termómetro estándar de referencia.

##### 2. DISTRIBUCION DE CALOR

Se realizaron 5 procesos: cámara vacía, cámara con charolas vacías y tres procesos con carga mínima consecutivos

Las temperaturas mínimas fueron encontradas en el termopar localizado en la línea de drenado. Siendo este un punto de referencia de la efectividad del desplazamiento del aire y eliminación del condensado, no se considera como punto frío.

Ningún termopar indicó temperaturas abajo de  $120^{\circ}\text{C}$ . la diferencia máxima de temperaturas fue de  $2.0^{\circ}\text{C}$  entre termopares en todos los ciclos.

##### 3. PENETRACION DE CALOR Y RETO MICROBIOLÓGICO

La localización de termopares se modificó para colocarlos dentro de los artículos para esterilizar, quedando estableci-

dos como lo indica la tabla ( III ).

Los termopares señalados con D, son de distribución; es decir, colocados fuera del artículo y los P son de penetración colocados dentro del artículo a esterilizar.

TERMOPAR No.	COORDENADAS (x, y, z)	ARTICULO	TERMOPAR ASOCIADO
D1	25,0,0	Drenaje	-
D2	25,0,0	Drenaje	-
D3	40,35,10	Uniforme	P1
D4	25,6,48	Guantes	P2
D5	10,6,74	Uniforme	P3
D6	10,6,15	Espátula	P7
D7	10,35,40	Uniforme	P5
D8	40,8,16	Rompemembranas	P6
-	-	Unidad de filtración	P4
-	-	Unidad de filtración	P8

Tabla ( III ). Localización de termopares en los estudios de distribución de calor en el autoclave de microbiología, ciclo de gravedad.

La evaluación del ciclo se realizó por medio del valor F considerando  $z = 10^{\circ}\text{C}$  y temperatura de referencia de  $121^{\circ}\text{C}$ , los

resultados se muestran en la tabla ( IV ).

El valor F mínimo encontrado fue de 49 minutos (el del drenaje no se considera).

La correlación entre distribución y penetración no se realizó debido a la gran variedad de artículos a esterilizar, tanto

TERMOPAR	CORRIDAS					
	1a.		2a.		3a.	
	A	B	A	B	A	B
D1	-	-	-	-	-	-
D2	9	-	52	-	48	-
D3	73	73	60	70	59	72
D4	52	62	50	70	51	69
D5	65	63	55	76	57	66
D6	56	59	51	72	52	76
D7	75	60	60	68	60	77
D8	49	48	50	63	51	58
P4	-	65	-	67	-	72
P8	-	62	-	69	-	69

Tabla ( IV ) Valores F encontrados durante los estudios de distribución (A) y de penetración (B), los signos (-) indican que no se determinaron.

en tanajos como en materiales. Únicamente se determinó que se alcanzaron mayores temperaturas dentro de los artículos que fuera de ellos.

#### 4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Después de 7 días de incubación las tiras de *B. stearothermophilus* expuestas a los ciclos de esterilización mostraron ausencia de crecimiento, los controles fueron adecuados.

#### D. Proceso de Esterilización de Material de Microbiología:

##### Ciclo de Líquidos

#### 1. CERTIFICACION DE TERMOPARES

Todas las certificaciones fueron satisfactorias; es decir, ningún termopar presentó diferencias superiores a 0.5°C con respecto al termómetro de referencia estándar.

#### 2. DISTRIBUCION DE CALOR

El 1er. proceso se eliminó por no alcanzarse la presión y temperatura adecuadas dentro del autoclave por deficiencias en el abastecimiento de vapor y se repitió.

Tanto los estudios de distribución de calor en cámara vacía, como en los tres procesos consecutivos con carga mínima, las

Temperaturas promedio durante el periodo efectivo de exposición muestran que el equipo abastece homogeneidad de calor para alcanzar las especificaciones, encontrándose variaciones máximas de temperatura de  $0.9^{\circ}\text{C}$ . La temperatura mínima fue de  $121.8^{\circ}\text{C}$ , permaneciendo todos los termopares por encima del mínimo especificado de  $121^{\circ}\text{C}$ . La tabla ( V ) muestra las temperaturas máximas y mínimas durante los estudios de distribución de calor.

### 3. PENETRACION DE CALOR

El nivel de penetración se evaluó mediante los valores F, como método comparativo con la distribución de calor, también se calcularon los valores F de los termopares adyacentes a los de penetración; estrictamente los valores F no se aplican a distribución, ya que deben permanecer los termopares dentro de los artículos a esterilizar.

En la gráfica 5 se observan variaciones considerables de F entre los termopares de distribución y penetración.

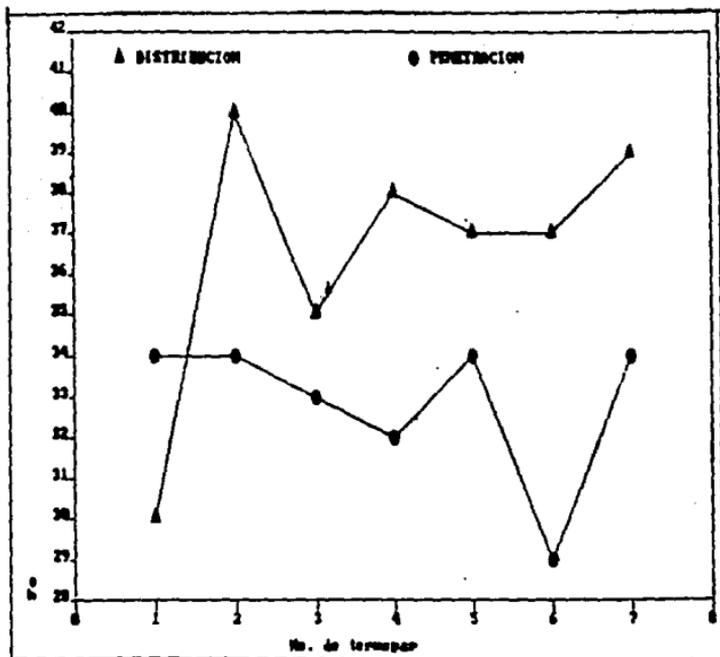
Debido a que se observó una correlación entre los valores F y la densidad y volumen se realizó un proceso especial para verificar el efecto, la distribución de termopares se observa en el diagrama 9. Los resultados están presentados en la gráfica 6.

## TERMOPAR

## TEMPERATURAS PROMEDIO

	1a.		2a.		3a.		
1	-	-	-	-	-	-	$\Delta T$
2	121.8	122.6	121.9	122.8	121.8	122.4	1.0
3	122.2	122.6	122.5	122.8	122.4	122.7	0.6
4	122.1	122.5	122.4	122.8	122.4	122.7	0.7
5	122.1	122.5	122.4	122.8	122.3	122.7	0.7
6	122.0	122.5	122.1	122.6	121.9	122.5	0.7
7	122.1	122.5	122.5	122.8	122.4	122.6	0.7
8	122.0	122.5	122.2	122.6	122.1	122.5	0.6
9	122.0	122.5	122.3	122.7	122.2	122.5	0.7
10	122.0	122.4	122.4	122.7	122.2	122.5	0.7
11	122.0	122.5	122.2	122.6	122.2	122.5	0.6
12	122.0	122.5	122.3	122.6	122.1	122.5	0.6
13	122.0	122.5	122.3	122.7	122.2	122.5	0.7
14	122.0	122.5	122.2	122.7	122.2	122.5	0.7
15	122.1	122.5	122.4	122.7	122.2	122.6	0.6
16	122.2	122.6	122.5	122.8	122.3	122.6	0.6
$\Delta T$	0.8		0.9		0.9		

Tabla ( V ). Temperaturas promedio obtenidas durante los estudios de distribución de calor para el proceso de esterilización de líquidos en el laboratorio.



Gráfica 5. Comparación de los valores F obtenidos por termopares de distribución vs. penetración en la esterilización de medios de cultivo de diferente densidad y volumen.

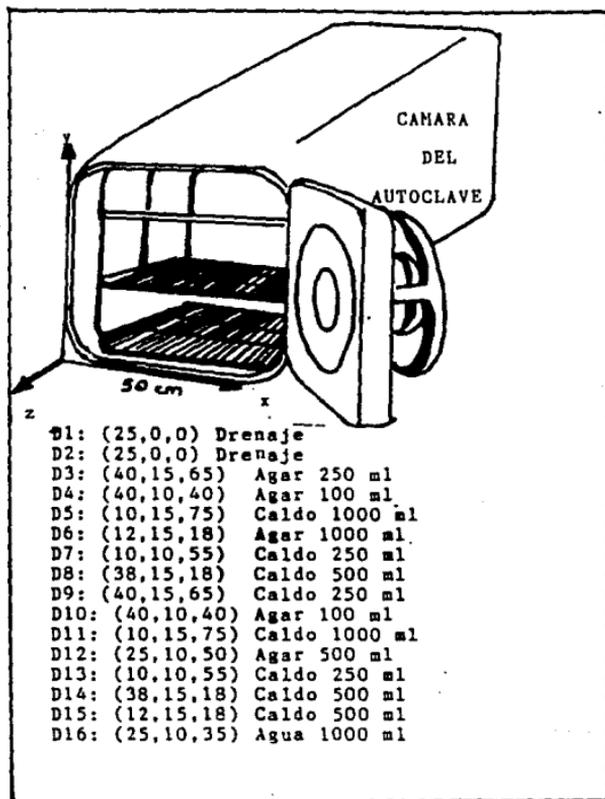
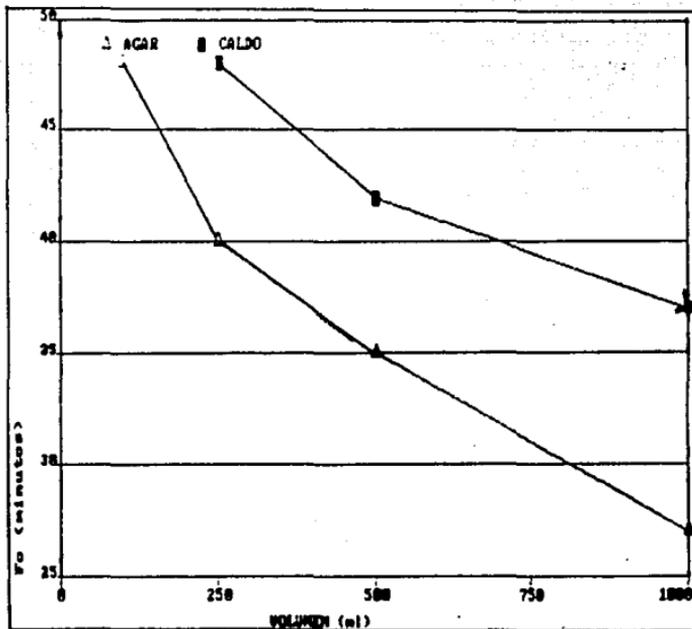


Diagrama 9. Localización de termopares indicando el medio de cultivo a esterilizar, para evaluar el efecto de la densidad y volumen sobre el valor F.



Gráfica 6. Representación gráfica de la dependencia de los valores F con el volumen del medio de cultivo en la esterilización, empleando diferentes densidades.

#### 4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para todas las muestras, la prueba de promoción de crecimiento resultó negativa (no se observó presencia de microorganismos), y los controles fueron adecuados.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Despirogenización de Ampoiletas

Las certificaciones de termopares realizadas al inicio y al final de los ciclos permiten considerar que las lecturas de temperaturas durante el tiempo de exposición son exactas, precisas y lineales ya que se evaluaron con coeficiente de variación y regresión lineal con las lecturas obtenidas.

En los estudios de distribución con cámara vacía se localizaron los puntos fríos D1, D11 y D13 con temperaturas promedio de 178, 173.9 y 178°C respectivamente, la especificación del ciclo indica un rango de  $180^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$ ; por lo tanto, el ciclo cumple satisfactoriamente.

En el estudio de distribución con carro y charolas vacías, el patrón de flujo de calor se modificó, encontrándose los puntos fríos D7, D9, D10, D11 y D12, el punto frío que se mantuvo fué el D11 y se incluyeron los restantes; no obstante, el argumento de la inclusión del carro y las charolas como causante de la modificación del flujo de calor, la temperatura promedio mínima durante el ciclo de exposición fué de  $165.3^{\circ}\text{C}$  en el termopar D9, estando dentro de especificaciones.

En el estudio de distribución de calor con carga mínima los

puntos frios en los tres procesos consecutivos debieron permanecer constantes ya que las condiciones de operación fueron constantes; sin embargo, en el 1er. proceso el punto frío localizado fué el D13 con temperatura promedio mínima de  $179.7^{\circ}\text{C}$ . en el 2o. proceso el punto frío se localizó en el termopar D16 con temperatura mínima promedio de  $178.7^{\circ}\text{C}$  y en el 3er. proceso fué el termopar D13 con temperatura promedio de  $174.6^{\circ}\text{C}$ . Las variaciones de puntos frios en los procesos consecutivos consideran la presencia posible de fugas de calor en el horno o deficiencias en el abastecimiento de calor por las resistencias durante los ciclos.

Posteriores investigaciones e inspecciones físicas detalladas del horno permitieron establecer que algunas de las rejillas del horno y sellos estaban dañados; por lo que fué necesario su reemplazo y programar una revalidación.

La penetración de calor se evaluó en los tres procesos consecutivos con carga máxima, la temperatura entre distribución con termopares localizados adyacentes al artículo es la misma que la temperatura de penetración con el termopar colocado en la superficie interna (vidrio), de las ampollitas, por lo que no aplica en el estudio hacer diferencias entre distribución y penetración de calor.

Las temperaturas obtenidas por los termopares cumplieron especificaciones, la localización de los puntos frios se modificó

y el punto frío D11 no se retó con endotoxina y bacilos, ya que no se consideró punto frío de acuerdo a los estudios en cámara vacía y cámara con carro y charolas vacías. se determinó en los estudios de penetración de calor.

El valor F obtenido en el punto frío fue 149 minutos equivalente a  $170^{\circ}\text{C}$  con un valor z de  $58.4^{\circ}\text{C}$ , por lo que no satisface la condición de 900 minutos. El valor z de  $56.4^{\circ}\text{C}$  está considerado en la literatura (8,9) como subestimar el proceso y redundante en mayor tiempo de exposición con el subsecuente desgaste de equipo y costo del mismo, se calculó en base a este valor z de acuerdo al protocolo de validación elaborado por la corporación.

El número de reducciones logarítmicas de endotoxina con un valor F de 149 minutos es de 2.5 por lo que no satisface, ya que el mínimo es de 3 reducciones logarítmicas de la concentración de endotoxina; por lo tanto, el equipo no se pudo emplear hasta que se corrigieron las deficiencias y efectuada la revalidación.

Las pruebas microbiológicas para promoción de crecimiento fueron negativas, por lo que el proceso esteriliza las ampollitas.

La prueba de pirógenos no se llevó a cabo correctamente ya que se inocularon 1400 UE por ampollita, cuando el procedi -

miento indica 250 UE por ampolla.

#### B. Proceso de Esterilización Final de Inyectables

Los estudios de distribución de calor mostraron que el equipo provee suficiente calor para alcanzar las especificaciones. (30 min.,  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Las variaciones máximas de temperatura fueron de  $1^{\circ}\text{C}$  y no se consideran puntos fríos, ya que no está fuera de especificaciones.

La correlación encontrada entre distribución-penetración de calor permite considerar que en toda la cámara se obtiene la temperatura deseada, las temperaturas más bajas registradas se localizan en el drenaje, pero en este punto no hay producto por lo que se omite.

El tiempo especificado de exposición a  $121^{\circ}\text{C}$  es de 30 minutos con el que se obtiene un valor F de 32 minutos, el mínimo especificado es de 12 minutos, considerando un 50% como factor de seguridad ya que la probabilidad aceptable de encontrar una unidad contaminada es de  $10^{-8}$ ; es decir, un valor F de 8 minutos.

Las pruebas microbiológicas cualitativas indican que se obtuvo esterilización, ya que ninguna de las muestras conteniendo las tiras bioindicadoras resultó positiva.

El ciclo cumple la especificación, no obstante existe un sobreproceso ya que con 15 minutos de exposición se obtiene un valor F de 15 minutos. El tiempo restante es pérdida de tiempo y dinero en toda la operación. se propone limitar a 15 minutos el tiempo de exposición y efectuar la revalidación.

### C. Esterilización de Material de Microbiología:

#### Ciclo de Gravedad

El equipo permite alcanzar la temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  en muy poco tiempo y ningún punto presenta temperaturas abajo de la especificación, por lo que se considera la ausencia de puntos frios.

La penetración de calor muestra buena correlación con la distribución de calor; no obstante, los valores F obtenidos indican que depende del material a esterilizar, el mas bajo fue localizado en el material plástico y el mas alto en el material metálico, como lo confirma la capacidad calorifica de estos materiales, se concluyó que para poder utilizar el proceso es necesario contar con diagramas de distribución, incluidos dentro del procedimiento estándar de operación, para no modificar el flujo de calor.

Los valores F son muy elevados, siendo el mínimo de 42 minutos y el mas alto de 86 minutos; está sobreprocesado, es necesario disminuirlo por razones económicas y posibles degradacio-

nes por el tiempo de exposición a 121°C.

El ciclo de esterilización consiste en una fase húmeda de 30 minutos, seguida de 15 minutos de secado, durante los 45 minutos la temperatura aproximada es de 121°C.

El cálculo del valor F no debe considerarse con un valor z de 10 minutos para ambas fases, ya que el valor z depende de la penetración de calor, siendo más elevado en la fase de vapor, para la fase de secado debe considerarse un valor diferente de z como diferencial, ya que la eliminación de vapor se presenta gradualmente.

Los retos microbiológicos sometidos a esterilización presentaron ausencia de crecimiento en las pruebas microbiológicas.

El ciclo está sobreprocesado, como lo demuestran los altos valores F.

El ciclo provee una alta seguridad de esterilización.

#### D. Esterilización de Material de Microbiología:

##### Ciclo de Líquidos

El equipo es el mismo que el empleado en el ciclo de gravedad, la distribución de calor presentó homogeneidad, no se puede considerar la existencia de puntos fríos.

La presencia de materiales de diferente densidad e.g. agar, caldo, agua y diferentes volúmenes no permite considerarlos individualmente como puntos fríos, sino como sistema en general.

Los puntos con menor penetración de calor se presentaron en los líquidos de mayor densidad y volumen (i.e. agar 1000 ml). Debido a que se requiere mayor calor para elevar la temperatura de un cuerpo con mayor volumen y densidad. Derivado de la ecuación de la capacidad calorífica:

$$Q = m C_p \Delta T, \quad m = \delta V$$

$$Q = \delta V C_p (T_2 - T_1)$$

$$T_2 = T_1 + \frac{Q}{\delta V C_p}, \quad \text{de donde:}$$

Q = calor

T<sub>2</sub>, T<sub>1</sub> = temperatura final e inicial

δ = densidad

V = volumen

C<sub>p</sub> = capacidad calorífica

Los valores F sobrepasan las especificaciones, no obstante se realizó un ciclo de desarrollo para determinar el volumen adecuado para obtener un mayor valor F. Se estudiaron los factores densidad y volumen, con la variable de respuesta el valor F.

Se concluyó disminuir el volumen de agar a esterilizar y se incluyó en el procedimiento estandar de operación de esterilización del laboratorio de microbiología.

Los resultados microbiológicos estuvieron dentro de especificaciones y el proceso se puede emplear rutinariamente.

## VII. CONCLUSIONES

La validación del proceso de esterilización y despirogenización de ampollitas vacías no satisfizo los requisitos de la calificación en los puntos de homogeneidad de calor ya que presenta fugas. El valor F mínimo de 149 minutos no fué satisfactorio, ya que el mínimo especificado es de 900 minutos para obtener 3 reducciones logarítmicas de endotoxina.

La validación del proceso de esterilización de inyectables se liberó para utilizarse rutinariamente por producción, ya que cumplió todos los requisitos de presión, temperatura, tiempo y retos microbiológicos, no obstante se considera que se debe limitar el tiempo de exposición a 15 minutos.

La validación de los procesos de esterilización de material de laboratorio se liberaron para utilizarlos normalmente con los patrones de carga especificados incluidos en el procedimiento estándar de operación de esterilización de material.

Se determinó que el volumen máximo de agar a esterilizar es de 500 ml, aunque está sobreprocesado ya que el valor F mínimo se obtiene en la 3a. parte del tiempo de esterilización establecido.

Los objetivos propuestos fueron cumplidos, ya que se correla-

cionaron los factores físicos de los procesos con la eficacia de la esterilización y despirogenización, para calificarlos y usarlos rutinarimente o su modificación.

### VIII. SUGERENCIAS

Emplear un valor  $z$  de 45.4 minutos para el cálculo del valor  $F$  en la validación del proceso de despirogenización, ya que es valor sugerido por Tsuji et. al. (8,9), en los estudios de cinética de destrucción de endotoxina.

Elaborar los formatos necesarios para los registros de presión, temperatura y diagramas de localización de termopares y reportes microbiológicos, para descargar los datos directamente y anotar fechas, horarios y las firmas de los responsables de los estudios y revisión de los procedimientos.

Limitar los tiempos de esterilización de inyectables y material de laboratorio a 15 minutos a la temperatura especificada de  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Efectuar las medidas necesarias para homogeneizar la distribución de calor en el horno de producción para esterilizar y despirogenizar ampollitas y elevar la temperatura de exposición a  $200^{\circ}\text{C}$ , para alcanzar el valor  $F$  especificado y repetir el estudio de validación.

IX. REFERENCIAS

- (1) Loftus, B. T.; Nash, R. A. Pharmaceutical Process Validation; Marcel Dekker Inc., New York 1984; "Organizing for validation"; Jeater, J. P., et. al. 11-27.
- (2) Agalloco, J. P., "The other side of process validation" Journal of Parenteral Science and Technology vol. 40, No. 6 nov-dic 1986 (251-252).
- (3) Loftus, B. T.; Nash, R. A.; Pharmaceutical Process Validation; Marcel Dekker Inc., New York 1984; "validation of sterile products"; Akers, M.J.; Anderson, N.R. 29-31.
- (4) The validation of steam sterilisers. Tutorial No. 2 Parenteral Society; Reeks, B.D. (1986).
- (5) Parenteral Drug Association Inc. Technical Report No. 3 "Validation of dry heat processes used for sterilization and depyrogenation" (1984).
- (6) L.A.L. Users Group. "Preparation and use of endotoxin indicators for depyrogenation process studies", Shirt, J.; et. al.; Journal of Parenteral Science and Technology Vol. 43, No. 3 mayo-junio 1989, pp. 109-113.

- (7) Proyecto de Norma Técnica que establece las guías generales de validación (1989).
- (8) The New York Times, miércoles 23 marzo (1971) Nr. 23,16:3  
"U.S. begins recall of infected fluids" Altman, L. K.
- (9) Loftus, B. T.; Nash, R.A.; "Pharmaceutical Process Validation"; Marcel Dekker Inc. New York 1984; "The regulatory basis for process validation"; Loftus, B.T. 1-9.
- (10) Lignau, J.; "Optimization and validation of manufacturing processes"; Drug Development and Industrial Pharmacy, 15 (5 y 7), 1029-1046 (1989).
- (11) Chapman, K.G.; Organization and design of a validation program for a pharmaceutical firm"; Conferencia 13 agosto 1990, Hotel Camino Real México.
- (12) Dawson, M. E., et. al. "Microbes, endotoxin and water" Pharmaceutical Engineering vol. 8, No. 2 mar-abril 1988 (9-12).
- (13) Tsuji, L.; Harrison, S. J.; "Dry heat destruction of Lipopolysaccharide: Dry heat destruction kinetics". Applied and Environmental Microbiology. Nov. vol. 35, No. 5 1978 (710-714).

- C14) Tsuji, L.; Lewis, A. R.; "Dry heat destruction of lipo = polysaccharide: Mathematical approach to process evaluation" Applied and Environmental Microbiology. Nov. vol. 33, No. 5, 1984 (715-719).

X. BIBLIOGRAFIA

- (1) Pildoras, Ganancias y Política, Silverman, M.; Lee, P. R. ed. Siglo XXI México (1983).
- (2) Begg, D. I.; Sykes, I. K. "Inspection of pharmaceutical plants manufacturing parenterals", Parenteral Manufacturing Vol. 44, No. 101, 1987 (1079-1082).
- (3) Tetzlaff, R.F.; "Systems validation for parenteral clinical drugs application to R and D and QC laboratories". Journal of Parenteral Science and Technology, Vol. 37, No. 2 1983 (5-9).
- (4) Baird, R.; "Validation of dry-heat tunnels and ovens" Pharmaceutical Engineering, Vol. 8, No. 2 1988 (31-33).
- (5) Akers, M. J.; "Understanding and utilizing Fo values" Pharmaceutical Technology, junio 1987 (44-46).
- (6) HIMA Reports. Medical Device Sterilization Monographs, Health Industry Manufacturers Association, Report No. 78 4.2, 1978.