

58
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

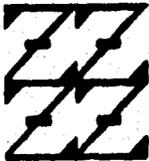
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**ESTABLECIMIENTO DEL PLAN MAESTRO DE
VALIDACION DE LOS CICLOS DE ESTERILIZACION
Y DESPIROGENIZACION REALIZADOS EN EL
DEPARTAMENTO DE INYECTABLES DE
BAYER DE MEXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
SANCHEZ ORTIZ LIDIA
VILLEGAS SOLIS MARICRUZ**

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO HUBIERO LEE
DE NUESTRA REFLEXION**

MEXICO, D. F.

ENERO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTABLECIMIENTO DEL PLAN MAESTRO DE VALIDACION
DE LOS CICLOS DE ESTERILIZACION Y DESPIROGENIZACION
REALIZADOS EN EL DEPARTAMENTO DE INYECTABLES DE
BAYER DE MEXICO**

NOMBRES: Sánchez Ortiz Lidia
Villegas Solís Maricruz

NUMERO DE CUENTA: 6734678-9
6720406-1

CARRERA: Químico Farmacéutico Biólogo

ORIENTACION: Farmacia

AÑO DE TERMINACION: 1994

ASESORES: César Escamilla Flores (interno)
Ramón Soto Vázquez (interno)
Cariota Medécigo Miceta (externo)

A mis padres, pues gracias a su ayuda, apoyo y comprensión he logrado alcanzar uno de los principales objetivos de mi vida.

A Oscar, por tu compañía, esfuerzo y amor.

A Hayde, por ser el principal motor de mi vida.

A mis hermanos, Humberto y Rocío, para que en el futuro puedan disfrutar la misma satisfacción que ahora tengo yo.

Y sobre todo gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de vivir.

LIDIA

Le doy gracias a Dios por todo lo que me ha dado.

A mis padres Chalo y Ramón, por su apoyo y comprensión.

A mi hermano Hugo, por estar siempre conmigo.

Dedico este trabajo a Marbe, Martha y Mimi que han compartido conmigo las alegrías y tristezas.

A Isela por su colaboración en la elaboración de este trabajo y a Lidia por su apoyo.

A Abraham por tu amor, apoyo y la alegría de estar juntos.

Es imposible mencionar a todas las personas que de una forma u otra han convivido conmigo formando parte de mi vida, pero a todos ustedes dedico este trabajo.

MARICRUZ

***Agradecemos a Bayer de México y especialmente al Dr. H. J. Oeken
por habernos permitido la realización de este trabajo y
habernos apoyado en todo momento.***

***Agradecemos a todo el personal del depto. de VT - Inyectables por su
colaboración en la realización de este trabajo, y porque al
conocerlos nos hicieron crecer en lo personal
y en lo profesional, especialmente
a Jesús.***

***Agradecemos a Carlota, Cesar y Ramón, su asesoramiento en
la realización de este trabajo, su apoyo y todos
sus consejos.***

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
2.1 VALIDACION	2
2.1.1 Validación prospectiva	2
2.1.2 Validación retrospectiva	3
2.1.3 Validación concurrente	3
2.1.4 Revalidación	3
2.1.5 Importancia de la validación	3
2.2 ESTERILIZACION	4
2.2.1 Métodos de esterilización	4
2.2.2 Esterilización por calor seco (horno)	7
2.2.2.1 Esterilizadores	8
2.2.2.2 Descripción horno Reinhardt	12
2.2.2.3 Aplicación	13
2.3 MICROBIOLOGIA DEL PROCESO DE ESTERILIZACION	14
2.3.1 Clasificación taxonómica de los microorganismos	15
2.3.2 Clasificación basada en el ambiente	16
2.3.3 Perfiles de contaminantes	17
2.3.4 Indicadores biológicos	17
2.4 VALIDACION DE LA ESTERILIZACION	19
2.4.1 Muerte microbiana. Términos cinéticos	19
2.4.2 Temperares	23
2.4.3 Equipo y material para la medición de temperatura	25
2.5 VALIDACION DE LA ESTERILIZACION POR CALOR SECO	25
2.5.1 Calificación de la instalación	26
2.5.2 Calibración	27
2.5.3 Calificación del equipo	27
2.5.3.1 Estudio cámara vacía	27
2.5.3.2 Estudio cámara con carga	27
2.5.4 Validación microbiológica del proceso	28
2.5.4.1 Indicador biológico	28
2.5.5 Revisión de los datos de la prueba	28
2.5.5.1 Análisis de varianza	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GENERAL	31
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	31
5. HIPOTESIS	32

6. MATERIAL Y METODO	33
6.1 MATERIALES.....	33
6.2 METODOLOGIA.....	34
6.2.1 Calificación del equipo.....	35
6.2.2 Calibración de termopares.....	35
6.2.3 Pruebas preliminares.....	35
6.2.4 Distribución de calor.....	36
6.2.4.1 Cámara vacía.....	36
6.2.4.2 Cámara con carga.....	36
6.2.5 Reto biológico.....	38
6.2.6 Patrones de carga.....	38
6.2.7 Número de corridas.....	39
6.2.8 Criterios de aceptación.....	39
7. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	40
7.1 CALIFICACION DEL EQUIPO.....	40
7.2 CAMARA VACIA.....	41
7.3 FRASCO DE 25 ml.....	44
7.4 FRASCO DE 50 ml.....	48
7.5 FRASCO DE 100 ml.....	52
7.6 FRASCO DE 250 ml.....	56
7.7 FRASCO DE 500 ml.....	60
8. CONCLUSIONES	65
8.1 SUGERENCIAS.....	66
9. ANEXOS	67
10. BIBLIOGRAFIA	71

1. INTRODUCCION

La esterilización y despirogenización se considera el paso principal en la manufactura de productos inyectables, pues el uso de un medicamento parenteral contaminado con microorganismos o pirógenos puede tener consecuencias fatales para el paciente, por ello es de vital importancia la comprobación de la efectividad de tal proceso.

El objetivo del presente trabajo es generar un plan maestro de validación que certifique la confiabilidad del proceso de esterilización por calor seco, para su empleo rutinario en la manufactura de tales productos.

Se realizó la validación del proceso de esterilización y despirogenización efectuado en un horno de aire caliente marca Reinhardt, en el cual se despirogeniza frasco ámbar de vidrio de diferentes capacidades (25, 50, 100, 250 y 500 ml) y casquillo de aluminio, utilizados para la manufactura de productos veterinarios inyectables.

Previo a la validación se realizó la inspección técnica del equipo, con la que se comprobaron sus especificaciones.

Durante la validación se efectuó la calificación de la instalación, operación y funcionamiento. Las temperaturas se registraron en el equipo Kaye Digistrip, usando termopares del tipo T. Como reto biológico se utilizó endotoxina de *Escherichia coli*.

Los resultados se evaluaron termodinámicamente con el valor FH, y microbiológicamente, concluyéndose de esta manera que el proceso de esterilización/despirogenización realizado en el horno cumple con los lineamientos sugeridos por FDA.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 VALIDACION

Desde 1976, la Food and Drug Administration (FDA) ha hecho hincapié sobre el término validación, que ha tenido un impacto significativo en la industria farmacéutica. En un principio se enfocó a la validación de procesos de esterilización. A principios de los 80's dirigieron su atención a la validación de procesos no estériles. (1)

La validación de procesos es un programa documentado el cual provee con un alto grado de exactitud que un proceso específico producirá consecuentemente productos que cumplan con sus especificaciones predeterminadas y los atributos de calidad. (2)

La validación puede ser:

- a) Validación Prospectiva
- b) Validación Retrospectiva
- c) Validación Concurrente
- d) Revalidación

2.1.1 VALIDACION 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 desarrollo). Se auxilia de la estadística. (3)

Los pasos más comunes de una validación prospectiva son:

- a) Calificación de los sistemas y subsistemas
 - Instalación
 - Operación
 - Calibraciones
- b) Aprobación del protocolo de validación
- c) Ejecución del protocolo
- d) Análisis de los resultados
- e) Aprobación de las conclusiones reportadas

La calificación de la instalación (IQ) puede definirse como la verificación documentada de que todos los aspectos claves de la instalación se apegan a las recomendaciones del fabricante, códigos apropiados e intenciones de diseño. (1)

La calificación operacional (OQ) es la verificación documentada de que el sistema o subsistemas ejecutan lo planeado a lo largo de todos los rangos de operación especificados. (1)

La calibración es la demostración de que un dispositivo de medición produce resultados dentro de límites especificados producidos por un instrumento estándar de referencia sobre un rango apropiado de mediciones. (1)

2.1.2 VALIDACION 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, principalmente requiere de técnicas estadísticas de análisis. (3)

2.1.3 VALIDACION CONCURRENTE

Es el establecimiento de la evidencia documentada de que un proceso cumple con el objetivo para el que fue planeado basado en información generada durante la implementación actual del proceso. Se auxilia de tratamientos estadísticos. (1)

2.1.4 REVALIDACION

Es la repetición del proceso de validación o una parte específica de éste. Se efectúa cuando se presenta un cambio en las condiciones validadas, como por ejemplo: cambio de proveedor de materia prima crítica, cambio de equipo o modificación significativa del equipo original, nuevo equipo, instalaciones o condiciones de operación, cambios de atributos o especificaciones del producto o cambios de formulación, cambios de personal y/o después de cierto período de tiempo. (1)

2.1.5 IMPORTANCIA DE LA VALIDACION

La prueba de validación se obtiene a través de la colección y evaluación de datos, desde el desarrollo de las fases del proceso, hasta las fases de producción. Así se conoce enteramente como se desarrollará éste, lo que da como beneficios la reducción en: rechazos, reprocesos, costos de utilidad, análisis de producto en proceso y terminado, además mayor rapidez e investigaciones precisas de cada paso del mismo proceso. Esto es posible pues se tiene la memoria documentada de cómo se efectúa el proceso, y al presentarse un problema se sabe dónde actuar y de qué manera solucionarlo.

La validación no es el mayor de los requerimientos regulatorios sino un mecanismo que mejora el control del proceso asegurando la calidad del producto.

2.2 ESTERILIZACION

El concepto tradicional de esterilización es la condición absoluta de la destrucción total o eliminación de todo organismo vivo. Para los productos farmacéuticos usualmente se limita a la ausencia de cualquier entidad capaz de sobrevivir o multiplicarse durante el almacenamiento del producto o su uso en humanos o animales. (4,5)

La esterilidad absoluta no puede demostrarse prácticamente sin la completa destrucción de cada producto terminado. Por lo tanto la esterilidad de un lote se basa en términos probabilísticos donde la probabilidad de una unidad contaminada es remota. (6)

Con los métodos de esterilización terminal de un producto parenteral, particularmente por vapor bajo presión, es alcanzable una probabilidad de no más de una unidad no estéril en un millón (10^{-6}). (4,5)

Los microorganismos (m.o.) exhiben una resistencia variable a los procedimientos de esterilización. El grado de resistencia varía con el organismo específico. La espora, la forma que preserva ciertos organismos durante condiciones adversas, es más resistente que la forma vegetativa del m.o. Por lo tanto, las condiciones requeridas para un proceso de esterilización deben planearse para ser letales a las esporas más resistentes de los m.o. encontrados normalmente. (5)

Los agentes esterilizantes se clasifican en físicos y químicos. Los agentes físicos son calor húmedo, calor seco, radiación ionizante y filtración; los agentes químicos son líquidos o gases, como fenol, formol y óxido de etileno. (7)

El método de esterilización se elige en función del producto, dependiendo de como impactará en su calidad y en la economía del proceso. (8)

2.2.1 METODOS DE ESTERILIZACION

a) Calor húmedo

El calor húmedo o vapor bajo presión es el método más estudiado, desarrollado por Pasteur y Chamberlain a fines del siglo XIX. Como con todos los métodos de esterilización la función celular de principal interés es la reproducción. El proceso reproductivo de los m.o. está dirigido por los ácidos nucleicos y mediados por enzimas, que entre otras cosas dirigen la síntesis de éstos y la construcción de componentes celulares. (8)

La estructura tridimensional de las proteínas (enzimas), determina su función, cuando se forman, la secuencia de aminoácidos dicta su forma. Si ésta cambia después de su formación (desnaturalización) entonces sus funciones

cambian. A menudo este cambio es irreversible y la célula pierde su función.

Durante la esterilización por calor húmedo esta desnaturalización irreversible de enzimas vitales da por resultado la muerte celular. Generalmente la esterilización por calor húmedo se lleva a cabo con agua y vapor saturado bajo presión (1.03 bar, 121°C). El vapor de agua interactúa directamente con las proteínas a una temperatura elevada para desnaturalizarlas. (8)

Ventajas:

*Proceso corto

*Es predecible y reproducible bajo condiciones definidas de operación

*Aplicable a material sensible a altas temperaturas

Desventajas:

*No despirogeniza

*Costo elevado

b) Calor seco

El calor seco también se usa para esterilizar materiales. Aquí altas temperaturas (160°C y 170°C), y largos períodos de tiempo son requeridos. Las células son destruidas principalmente por la oxidación inespecífica de componentes celulares a través de temperaturas elevadas. El sitio exacto de acción es desconocido. (8)

Ventajas:

*Despirogeniza

*Es predecible y reproducible bajo condiciones definidas de operación

*Se puede usar cuando es indeseable el uso de vapor

Desventajas:

*El calentamiento es pobre

*Se requieren períodos largos de esterilización

*Requiere altas temperaturas lo cual agrava los efectos del deterioro

*Los materiales esterilizados pueden ser susceptibles a daño o degradación (7)

c) Oxido de etileno

El óxido de etileno (EtO) es el gas esterilizante usado más comúnmente, es un agente alquilante y mediante este mecanismo se logra la muerte celular. El EtO reemplaza los hidrógenos lábiles con grupos hidroxietilo. Macromoléculas

como las proteínas contienen grupos funcionales cuyos hidrógenos son lábiles a la alquilación. Como muchos de estos grupos juegan un papel importante en la estructura y función de las proteínas su modificación por ETO destruirá su actividad. (8)

Ventajas:

- *Efectivo contra esporas y células vegetativas
- *Es la mejor sustancia para desinfección gaseosa de superficies secas
- *Es muy soluble en agua
- *Se utiliza para objetos sensibles al calor

Desventajas:

- *Proceso caro
- *Acción menor que la del vapor
- *Los residuos pueden ser tóxicos
- *Mutagénico y carcinogénico
- *Es explosivo

d) Radiación

La letalidad de la radiación ionizante se debe a efectos directos (predominantes) e indirectos. Los primeros implican interacción de la radiación con el ácido desoxirribonucleico (DNA). La energía liberada rompe su estructura, impidiendo la reproducción celular. Los efectos indirectos son los atribuidos a productos de reacción generados por la radiación y el agua (p. ejem. radicales libres y peróxidos). (8)

Ventajas:

- *Da a las células una carga más intensa de energía

Desventajas:

- *La cantidad necesaria para matar bacterias, muchas veces lesiona el producto
- *Puede originar olores y sabores diversos en alimentos

e) Filtración

En contraste a los métodos anteriores, la filtración depende de la remoción física de los m.o. y no de su destrucción. Los filtros de profundidad compuestos de fibras prensadas al azar remueven por una combinación de absorción y atrapamiento en su estructura interna. Los filtros tamiz (membrana), formados por un proceso controlado de precipitación de polímeros usan un mecanismo de cedazo. Estos son más usados por su confiabilidad y predecibilidad. (8)

Ventajas:

*Se utiliza en soluciones farmacéuticas termolábiles

Desventajas:

*Es muy limitado su uso

2.2.2 ESTERILIZACION POR CALOR SECO (HORNO)

Los esterilizadores por calor seco generalmente usan métodos de calor convectivo para incrementar la temperatura del producto. La convección es una forma de transferencia del calor por medio del cual éste fluye de un cuerpo a otro debido a la diferencia de temperatura entre ellos. La energía se transfiere al aire de las resistencias calientes. El aire calentado transfiere energía a los objetos. La velocidad de transferencia de calor se relaciona al calor específico de los diferentes materiales. El aire tiene la desventaja de tener un calor específico relativamente bajo, de ahí que la transferencia de energía sea relativamente lenta. El vapor saturado es excelente para la transferencia de calor, pues su calor específico es relativamente alto (1.00065 cal/g°C) y el del aire es de 0.1716 cal/g°C. (8)

La conducción es otro medio de transferencia de energía, efectuado por interacción molecular donde los átomos a altas temperaturas vibran e imparten energía (como calor) a los átomos adyacentes de menor energía. Los materiales transfieren energía del material de mayor temperatura al de menor, pues los electrones en un estado excitado bombardean y chocan con los electrones de menor energía. La excitación de las moléculas del objeto incrementan el nivel de energía molecular, por lo cual incrementa su temperatura. (8)

La velocidad con que ocurre la conducción del calor depende de los materiales involucrados. Una sustancia con una alta conductividad térmica es un buen conductor de calor, una con baja conductividad térmica es un pobre conductor de calor. El aire no es considerado un buen conductor por ello es necesario un período largo de esterilización a muy altas temperaturas. (8)

La radiación es el tercer método usado para la esterilización por calor seco. Los fotones son paquetes concentrados de energía que pueden ocupar diferentes niveles de energía. Viajan como una onda electromagnética emitida por el material. Esta propagación transfiere energía térmica a los objetos e incrementa la temperatura de la superficie. La radiación puede usarse como una sola fuente de calentamiento, o en combinación con los métodos anteriores. (8)

La esterilización de la carga es típicamente lenta en su calentamiento y enfriamiento, y tiene una tendencia hacia la temperatura de estratificación (causando amplias variaciones de temperatura durante el ciclo). (8)

Ayuda al proceso de calentamiento, un sistema que incrementa la circulación del aire caliente. Durante el ciclo de elevación del calor, la circulación del aire transfiere aire frío de la cámara o zona de calentamiento y previene la estratificación de la temperatura. El aire de más alta temperatura reemplaza al aire frío, y la carga puede calentarse más rápido. (5)

El tiempo del ciclo consta de tres partes:

- a) El tiempo de incrementación térmica (la cámara y la carga están a temperatura ambiente)
- b) El período de calor a la temperatura máxima
- c) El tiempo de enfriamiento. (5)

Aún con estas limitaciones el calor seco es elegido como el método preferido para esterilización y/o despirogenización. El material de vidrio se esteriliza idealmente por calor seco. (8)

Algunos procesos por calor seco intentan proveer solo esterilización, en otros casos se requiere esterilizar y despirogenizar. Cuando el objetivo del ciclo es la despirogenización (Inactivación de la endotoxina) se utiliza endotoxina de *Escherichia coli* como reto biológico, colocándola en la parte más fría de la carga. La presencia de endotoxina residual puede detectarse con la prueba de pirógenos realizada en conejos o la prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), de acuerdo a la United States Pharmacopeia (USP XXIII). (5,9)

El término endotoxina usualmente denota un extracto impuro de lipopolisacárido que contiene componentes proteínicos de la pared celular de bacterias gramnegativas. (10)

2.2.2.1 Esterilizadores

Los tipos de esterilizadores comúnmente empleados en la industria farmacéutica son hornos y túneles esterilizantes de fuerza de convección, túneles esterilizantes por infrarrojo y esterilizadores de flama continua. (8)

El calentamiento por convección es el método de transferencia de calor a través de un medio por el movimiento de sus partes. Existen dos tipos de convección: natural y forzada. La primera es el resultado de la flotación generada por la diferencia en la densidad causada por los gradientes de temperatura en la masa fluida. La convección forzada se realiza por la acción de un dispositivo mecánico. (9)

Los hornos esterilizadores por fuerza de convección (Figura 1) son los más usados en la industria. Pueden emplear una serie de ciclos (por variación de tiempo y temperatura ambiente) para utensilios, material de vidrio, equipo de acero inoxidable y producto. Los objetos son preparados y controlados en un área no estéril, se cargan sobre anaqueles o carros y se colocan en la cámara del esterilizador. De acuerdo con la USP un ciclo de esterilización puede ser a un

mínimo de 170°C por lo menos 2 horas y para despirogenizar puede ser de 250°C por al menos 30 minutos. Así los ciclos se asignan excediendo el mínimo de tiempo y temperatura indicados para proveer una seguridad adicional y alcanzar la esterilización y despirogenización. Un ciclo típico emplea temperaturas entre 180°C a 300°C. Convencionalmente hay una fase de enfriamiento contemplada en el ciclo de calentamiento (Figura 2). En la mayoría de las instalaciones el horno emplea una doble puerta y la carga es removida del horno hacia el área aseptica. (8)

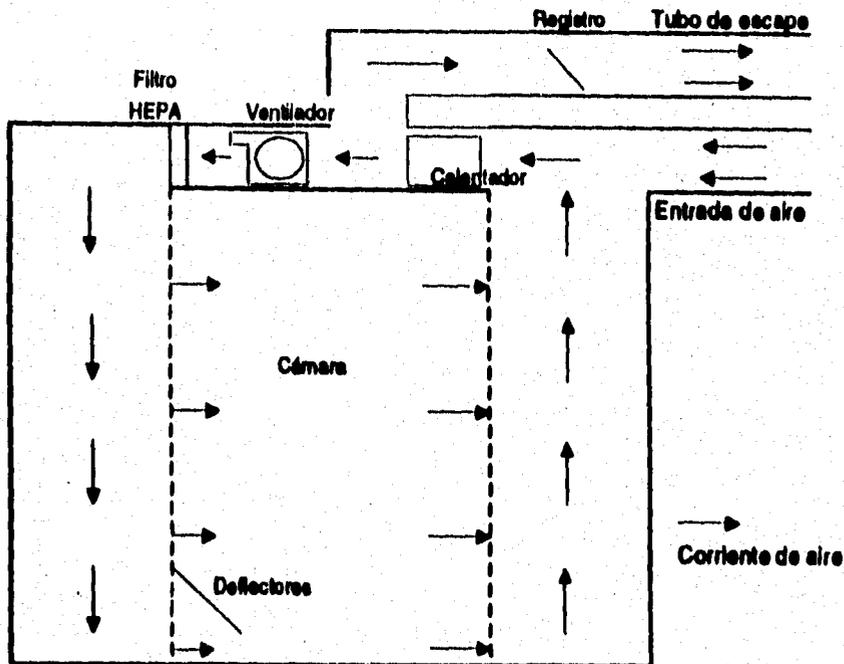


Figura 1. Esquema de Horno esterilizador. (8)

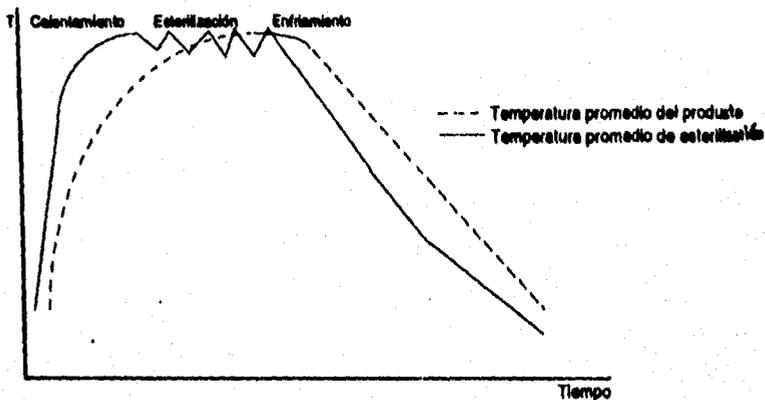


Figura 2. Proceso de esterilización en Horno. (8)

Algunos túneles esterilizantes utilizan transferencia de calor por convección, y otros radiación infrarroja para producir esterilización y/o despirogenización. Operan continuamente y procesan una cantidad mayor de viales y ampollas que el horno (Figura 3). Estas se lavan y cargan en el área no aséptica y se llevan a lo largo del túnel, encontrando aire de varias temperaturas. El material de vidrio se calienta en la porción inicial y central del túnel a 250°C-450°C y gradualmente se enfría por aire filtrado (filtros HEPA en la porción final del túnel) (Figura 4). El túnel se calienta por convección mediante resistencias eléctricas. Los esterilizadores por infrarrojo utilizan como fuente de radiación altas resistencias de alambre o tubo de cuarzo, los sensores de temperatura se colocan dentro de la zona de esterilización. El tiempo de calentamiento y de exposición puede afectarse por la geometría, color, superficie o composición de los objetos tratados así como de la temperatura o velocidad del aire. (8)

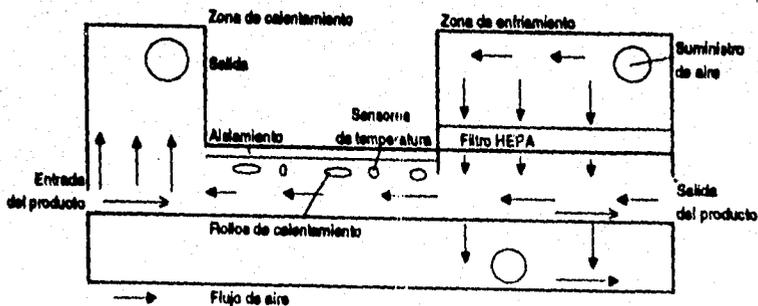


Figura 3. Esquema de túnel esterilizador. (8)

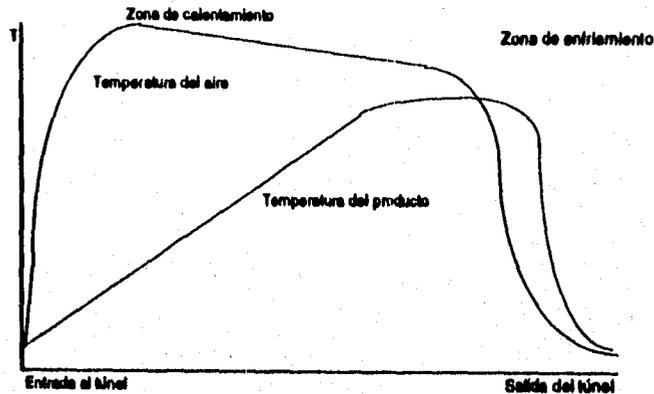


Figura 4. Gráfica de esterilización de un túnel esterilizante. (8)

Los esterilizadores de flama utilizan transferencia de calor por conducción y convección continua (Figura 5). El proceso esteriliza 10 000 ampollitas por hora. Las ampollitas se colocan en la zona del túnel, se lavan con agua por inyección colocándose en una rueda rotatoria. Las ampollitas se calientan a 426.6°C por gas natural en aproximadamente un minuto, pasan de la cámara de calentamiento hacia una cámara de enfriamiento, donde son gradualmente enfriadas por aire filtrado por filtros HEPA. Las ampollitas frías se llenan y sellan a la flama. Los esterilizadores de flama tienen una serie de deflectores en la cámara de esterilización que incrementan la uniformidad del calentamiento. (6)

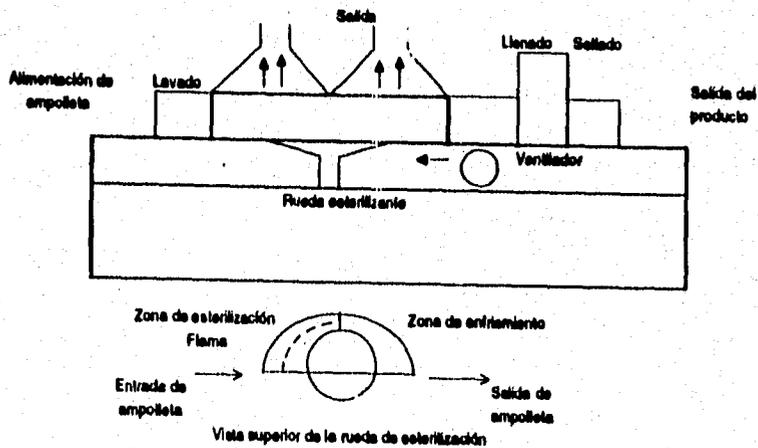


Figura 5. Esquema del esterilizador de flama. (8)

2.2.2.2 Descripción Horno Reinhardt

Los esterilizadores de aire caliente marca Reinhardt son adecuados exclusivamente para procesos secos y tratamientos de calor en los cuales no debe nunca existir liberación de solventes inflamables o mezclas que puedan incendiarse.

La mayoría de los esterilizadores de aire caliente constan de una caja de doble pared de acero inoxidable, reforzado con robustos marcos de perfil de acero. En el frente y en el lado posterior se encuentran puertas de dos hojas y doble pared perfectamente aisladas con empaques de perfil de espuma de silicón equipadas con manija y cerrojo para el pase de los carros. Las puertas se cierran mediante cilindros neumáticos al igual que la cámara de esterilización.

La cámara de esterilización debe estar aislada con una capa de 150 mm de aislante de fibra de vidrio de alta calidad. En el techo de la cámara está colocado, en forma fácil de cambiar, la instalación de calefacción que consta de elementos tubulares de calefacción, de alta calidad con cubierta de tubo de acero Cr-Ni (acero inoxidable).

La calefacción está subdividida en dos grupos manejables en forma automática pero independiente uno del otro, mediante el regulador de temperatura eléctrico de dos puntos (regulador de temperatura de circulación), para la adaptación al requerimiento de calor de cada caso. La temperatura de esterilización se regula a través de un termoelemento sensible dentro de una botella mediante un segundo regulador de temperatura de tres puntos (temperatura de esterilización). Estos están conectados uno tras otro en serie y manejan la capacidad de calefacción de acuerdo a la necesidad del calor.

La calefacción se conecta en dependencia el ventilador de circulación de tal manera que al fallar el soplador se desconecta automáticamente. La circulación del aire se efectúa a través de un ventilador construido en el techo que puede desmontarse para su limpieza. Este ventilador sopla el aire por medio de la instalación de calefacción a través de los canales de inyección instalados en el techo de la cámara del lado izquierdo y derecho del espacio útil y aspira el aire de regreso por el techo de la cámara.

El tubo de aire fresco y el de extracción de aire se ubican a través del techo de la cámara, al primero se le adjudica un filtro de paso que se instala entre los techos del lado de la instalación, el funcionamiento del ventilador de aire fresco se efectúa directamente con un motor de corriente alterna, además a ambos tubos se les instala una mariposa de cierre hermético y otras sin él, las cuales son manejadas mediante un cilindro neumático simple a través de la conexión de retraso o mediante el regulador de temperatura de vapor así como de extracción. Las mariposas están ajustadas a las capacidades de aire durante la fase de elevación de temperatura y la vaporización (si el material está mojado).

Los vapores que se liberan durante el proceso de vaporización deben extraerse por vía directa a través de una conducción de la chimenea acoplada al tubo de extracción hacia afuera del espacio de emplazamiento de la instalación. En esta conducción de chimenea deberá evitarse cualquier desviación, en caso necesario en el tubo de aire fresco también deberá adaptarse una conducción de chimenea.

El interruptor de presión para la supervisión de ventilación está instalado en el tubo de extracción y se desconecta automáticamente a la calefacción al fallar el ventilador de circulación.

Los termoelementos (fierro, cobre y níquel) para determinar la temperatura de la circulación de aire, temperatura de extracción y vaporización, así como el primer sitio de medición del graficador de seis colores se sumergen desde el techo de la cámara al espacio útil. Los termoelementos flexibles para el regulador de temperatura de esterilización, así como los sitios de medición 2 al 6 del graficador de temperatura pueden emplearse repartidos en botellas individuales. En el techo de la caja del exterior se encuentra el armario de conexión global para la conexión de las líneas de corriente y de mando al armario de distribución para colocación libre.

Junto a la caja de conexiones está instalado dentro de una caja cerrable el regulador de temperatura límite. Este termostato de seguridad desconecta automáticamente la instalación al sobrepasar la temperatura máxima indicada. En el techo de la caja externa, también se encuentra la unidad de servicio, y las válvulas magnéticas para el manejo de las mariposas de aire y el cerrojo de la puerta. Todos los aparatos de interrupción y regulación necesarios para el funcionamiento de la instalación están alojados en la caja de conexiones para colocación libre.

El interruptor general, interruptor girable, tecla de presión, tecla de llave, los diversos reguladores de temperatura con indicador de valor real, el graficador de seis colores, el aparato de conexión relevado, así como el reloj de conexión de tiempo y las lámparas de control se ubican en el techo frontal de este armario de conexiones. Los indicadores de valor real instalados en los aparatos reguladores indican la temperatura medida en seis puntos durante el desarrollo del programa y se registran en el graficador de punto de seis colores.

2.2.2.3 Aplicación

El calor seco es usado únicamente para aquellos materiales que no pueden esterilizarse por calor húmedo, o en el caso de ciertos envases de vidrio, donde es indeseable el uso de vapor. Materiales que rutinariamente se esterilizan por calor seco son petroliatos, aceites, polvos, instrumentos de acero inoxidable, jales y envases de vidrio. El poder de penetración del calor es la principal ventaja para el uso del calor seco. (9,11)

a) Envases de vidrio

La esterilización de los envases de vidrio es influenciada por el tipo de vidrio del envase. Envases de vidrio tipo I pueden esterilizarse antes o después del llenado con solución mientras que envases de vidrio tipo II y III pueden esterilizarse por calor seco antes del llenado (Tabla I). (12)

TIPO	DESCRIPCIÓN	USOS
I	Vidrio borosilicato de alta resistencia.	Soluciones acuosas, buffers y no buffers. Todos usos.
II	Vidrio de cal sodada tratado.	Soluciones acuosas, buffers con pH bajo 7, polvos secos, soluciones oleaginosas.
III	Vidrio de cal sodada.	Polvos secos, soluciones oleaginosas.

Tabla I. Clasificación del vidrio de acuerdo a la USP XXIII.

b) Despirogenización

En algunos casos el propósito del proceso por calor seco es tanto la esterilización como la despirogenización. Cuando la despirogenización se desea como punto final se necesitan altas temperaturas y/o largos períodos de calentamiento. La letalidad obtenida por estos ciclos provee un margen de seguridad mayor a la probabilidad de 10^{-6} de no estériles. (9)

No existe una regulación uniforme que describa las condiciones para una inactivación eficiente de endotoxina. Mientras que la USP y FDA requieren una reducción de 3 logaritmos, no existe regulación europea para la despirogenización. Sin embargo la Farmacopea Europea especifica las condiciones de temperatura y tiempo para vidrio en la monografía para la prueba de pirógenos: 250°C por 30 minutos o 200°C por 60 minutos, los cuales no son equivalentes. (13)

La USP sugiere que la validación de los métodos por calor seco incluya el reto con esporas bacterianas (*Bacillus subtilis*) y pirógenos (endotoxina de *E. coli*). USP XXIII recomienda que para validar los ciclos de despirogenización deben cargarse contenedores aprobados con mínimo 1000 unidades de endotoxina (UE), usando LAL para demostrar inactivación de no mas que 1/1000 de la cantidad original (3 log). (14, 15)

2.3 MICROBIOLOGIA DEL PROCESO DE ESTERILIZACION

La caracterización de cualquier método de esterilización incluye los siguientes elementos:

- a) Elección de un indicador biológico resistente al método.
- b) Influencia de variables en la destrucción del indicador tales como propagación de esporas, interacción entre esporas.
- c) Cuantificación de la efectividad de remoción de m.o. (8)

2.3.1 CLASIFICACION TAXONOMICA DE LOS MICROORGANISMOS

Los grupos taxonómicos están basados en la complejidad de los organismos en términos de crecimiento y reproducción. (8)

a) Virus

El grupo taxonómico más simple son los virus. Están compuestos por una cápsula de proteína que contiene el ácido nucleico (DNA o RNA). Se reproducen introduciéndose a una célula dirigiendo su actividad, obligándola a formar más virus. Miden fracciones de micras. Tienen gran habilidad de sobrevivir en ciertos ambientes debido a su estructura simple. (8)

b) Bacterias

Son organismos unicelulares, capaces de vivir en ambientes muy diversos. Se reproducen rápidamente principalmente por fisión binaria. Afortunadamente la mayoría son inofensivas o beneficiosas al hombre. Las dañinas o patógenas son pocas en número y en muchos casos fácilmente controlables. Sin embargo cualquier bacteria puede ser peligrosa si atraviesa las defensas corporales. Miden desde una fracción de micra hasta varias micras. Existen en 3 formas básicas: cocos (esferas), bacilos (cilindros) y espirilos (en forma de sacacorchos). Existen dos grandes grupos que pueden diferenciarse por la reacción de su pared con los colorantes (tinción de Gram). Las bacterias que retienen el cristal violeta se observan púrpuras y se llaman Gram positivas. Las Gram negativas no lo retienen al tratarse con un decolorante y se les aplica un colorante de contraste (safranina) lo que les da un color rojo. (8)

Una característica bacteriana con aplicación especial en la esterilización es su habilidad de producir formas latentes en respuesta a condiciones adversas del ambiente (esporas). (4)

c) Hongos

Pueden ser organismos uni o pluricelulares. Los unicelulares se llaman levaduras y son esféricas u ovals. Son mucho mayores que las bacterias. Algunas forman esporas mucho menos resistentes que las bacterianas. Los pluricelulares forman largas cadenas enramadas (micelio). (8)

2.3.2 CLASIFICACION BASADA EN EL AMBIENTE

Los microorganismos también pueden describirse por su habilidad para crecer bajo diversas condiciones ambientales. Algunas de ellas son: temperatura, pH, fuente de alimentación y requerimiento de oxígeno. (8)

a) Temperatura

Todos los microorganismos poseen una temperatura óptima a la cual crecen y se reproducen. Existen tres grandes grupos: psicrófilos, mesófilos y termófilos (Tabla II).

GRUPO	TEMPERATURA	EJEMPLO
Psicrófilos	0-10°C	<i>Achromobacter</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Alcaligenes</i>
Mesófilos	10-45°C	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>
Termófilos	50-90°C	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Lactobacillus</i>

Tabla II. Géneros representativos de los grupos de crecimiento por temperatura. (8)

b) pH

Existen tres grupos de crecimiento con respecto al pH: acidófilos (organismos asociados con la fermentación láctica), neutrófilos (contaminantes farmacéuticos) y alcalinófilos (digestores de proteínas y organismos del suelo) (Tabla III). (8)

GRUPO	EJEMPLOS
Acidófilos pH 1-5	<i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>
Neutrófilos pH 6-8	<i>Escherichia</i> <i>Bacillus</i>
Alcalinófilos pH 9-14	<i>Vibrio</i>

Tabla III. Géneros representativos de los grupos de crecimiento a pH. (8)

c) Fuente de alimentación

Los microorganismos se clasifican en 2 grupos respecto a su fuente de alimentación: autótrofos y heterótrofos. Los primeros sintetizan todos los componentes requeridos para su crecimiento y reproducción de fuentes inorgánicas (*Rhodospseudomonas*,

Escherichia). Los heterótrofos usan compuestos orgánicos en su metabolismo (*Chromatium, Thiobacillus*). (8)

d) **Requerimiento de oxígeno**

Existen dos grandes grupos de microorganismos basados en su requerimiento de oxígeno: aerobios y anaerobios. Los primeros requieren oxígeno para su existencia, mientras que para los segundos es venenoso. Sin embargo existen m.o. que pueden vivir bajo condiciones de ausencia o presencia de oxígeno llamados facultativos. También existe un grupo de aerobios que requieren oxígeno para crecer pero a muy baja concentración, llamados microaerófilos (Tabla IV). (8)

REQUERIMIENTO DE OXÍGENO	EJEMPLOS
Anaerobio estricto	<i>Clostridium</i> <i>Bacteroides</i>
Aerobio estricto	<i>Bacillus</i> <i>Micrococcus</i>
Facultativo	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>
Microaerófilos	<i>Leptospira</i> <i>Lactobacillus</i>

Tabla IV. Géneros representativos de grupos con diferentes requerimientos de oxígeno.(8)

2.3.3 PERFILES DE CONTAMINANTES

Un proceso de manufactura usualmente tiene un perfil característico de organismos que pueblan su ambiente (microflora), su composición es función de factores como los materiales, el aire y la gente. El conocimiento de la microflora es importante pues al existir contaminación puede detectarse la fuente y eliminarse. (8)

2.3.4 INDICADORES BIOLÓGICOS

Un indicador biológico es un sistema que contiene microorganismos de concentración y resistencia térmica conocida, del cual puede esperarse que siga una velocidad de muerte predecible cuando se le exponga a parámetros físicos y químicos particulares. (16)

Aunque cada método de esterilización usa un organismo específico, todos los indicadores tienen ciertas características comunes:

- a) Resistencia inherente al método de esterilización.
- b) Resistencia estable y reproducible al método de esterilización al usarse bajo condiciones definidas.
- c) Recuperación eficiente después de su exposición.
- d) No patogénico.
- e) Característico de los organismos que se pueden encontrar en el producto (generalmente esporas). (8)

La esterilización por calor húmedo, seco, ETO y radiación se valida con esporas de bacterias grampositivas. La esterilización por filtración se hace con bacterias gramnegativas (Tabla V). (8)

METODO DE ESTERILIZACION	INDICADOR BIOLÓGICO
Vapor	<i>B. stearothermophilus</i>
Calor seco	<i>B. subtilis var. niger</i>
ETO	<i>B. subtilis var. globigii</i>
Radiación	<i>B. pumilus</i>
Filtración	<i>Pseudomona diminuta</i>

Tabla V. Métodos de esterilización y su indicador biológico. (8)

Los indicadores biológicos han sido usados tradicionalmente en la validación y el monitoreo de rutina del proceso de esterilización usado para la manufactura y control de productos médicos y farmacéuticos. (17)

El uso de indicadores biológicos no es obligatorio para el control de rutina del proceso de esterilización. Cuando se usan, deben distribuirse, si es posible, dentro de los contenedores a esterilizar, eligiendo los lugares correspondientes a los puntos de medición de la temperatura. (18)

Se utilizan como auxiliares en la operación de la calificación física de aparatos de esterilización, en el desarrollo y establecimiento de un proceso de esterilización validado para un producto, en la verificación periódica de esterilización de equipo, materiales y componentes de empaque que se emplean en procedimientos asépticos y en programas de verificación periódica de ciclos de esterilización previamente establecidos y documentados. (19)

La validación de los bioindicadores debe demostrar que éstos:

- a) No contienen microorganismos ajenos (prueba de pureza)
- b) Cumplen con los parámetros de resistencia al calor declarados (tiempo de sobrevivencia y muerte)

Para la determinación de la concentración celular se realiza la cuenta total de unidades formadoras de colonias por diluciones, y la cuenta de esporas eliminando las células viables mediante un choque térmico. El número de células

recuperadas por tira no debe ser menor del 50% ni mayor del 300% del valor declarado en la etiqueta.

En la prueba de pureza se aíslan los microorganismos y se observan al microscopio utilizando la tinción de Gram. No deben presentarse microorganismos ajenos.

La resistencia al calor se determina con los tiempos de sobrevivencia y muerte exponiendo el bioindicador a la temperatura indicada para éstos durante el tiempo especificado, las tiras se sacan inmediatamente después y se incuban, observándolas cada 24 horas durante 7 días. Las tiras sometidas a la temperatura y tiempo de sobrevivencia deben presentar crecimiento característico, las sometidas a temperatura y tiempo de muerte no deben presentar crecimiento.

2.4 VALIDACION DE LA ESTERILIZACION

La validación del proceso de esterilización puede alcanzarse demostrando que el proceso destruirá, de manera consistente la carga microbiana con un factor de seguridad apropiado. (9)

Los principios básicos para validar y certificar el proceso son:

- a) Establecer que el equipo tiene la capacidad de operar dentro de los parámetros requeridos.
- b) Demostrar que el equipo crítico de control e instrumentación es capaz de operar dentro de los parámetros prescritos para el proceso.
- c) Ejecutar ciclos replicados representando los rangos operacionales requeridos del equipo, empleando producto real o simulado. Demostrar que el proceso se lleva a cabo dentro de los límites prescritos en el protocolo y finalmente que la probabilidad de sobrevivencia microbiana en los ciclos no es mayor que la de dichos límites.
- d) Monitorear el proceso validado durante la operación de rutina. Si es necesario, periódicamente recalificar y recertificar el equipo. (6)

2.4.1 MUERTE MICROBIANA. TERMINOS CINETICOS

a) Valor D

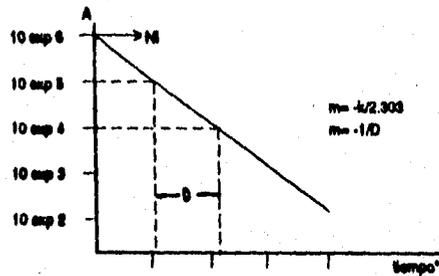
El valor D es una expresión cuantitativa de la velocidad de muerte de los microorganismos. Es el tiempo (por exposición química o calor), o la dosis (por exposición a radiación) requerido para que la población microbiana disminuya por un punto decimal (una reducción del 90% o de una unidad logarítmica). Puede calcularse gráfica o matemáticamente (Figura 6). (1,9,20)

$$D = U / (\log N_i - \log N_f)$$

U = Tiempo de exposición bajo condiciones específicas

N_i = Población microbiana inicial

N_f = Población microbiana final



A = número de microorganismos sobrevivientes

* = condición específica de temperatura, concentración de gas o radiación

m = pendiente de la recta

Figura 6. Representación gráfica semilogarítmica de la velocidad de muerte microbiana. (8)

El valor D se determina experimentalmente por dos métodos:

* Método de curva de sobrevivencia

Se realiza graficando el logaritmo del número de microorganismos sobrevivientes contra la variable independiente (tiempo, concentración de gas o dosis de radiación).

** Método de fracción negativa

Este método usa muestras replicadas conteniendo una cantidad idéntica de esporas, tratadas de manera idéntica y determinando el número (fracción) de muestras que presentan crecimiento después del tratamiento y la incubación. (1)

b) Valor Z y F

El valor Z es el recíproco de la pendiente resultante de graficar el logaritmo de D contra la temperatura a la cual se obtuvo este valor (mínimo tres diferentes temperaturas).

Puede simplificarse como la temperatura requerida para una reducción de un logaritmo en el valor D (Figura 7). (1)

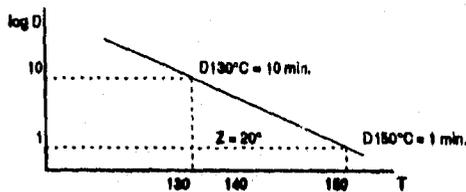


Figura 7. Representación gráfica del valor Z. (20)

$$Z = \frac{(T_2 - T_1)}{(\log D_1 - \log D_2)}$$

La magnitud de la pendiente indica el grado de letalidad relativo si la temperatura aumenta o disminuye.

La derivación matemática de la ecuación del valor Z permite el cálculo de una expresión cuantitativa para el tiempo de exposición efectivo a la temperatura deseada para la esterilización: valor F. (1)

$$F = \Delta t \sum 10^{(T-T_0)/Z}$$

Δt = intervalo de tiempo
 T = temperatura del producto
 T_0 = temperatura de referencia

El valor Z más comúnmente empleado para la destrucción de esporas microbianas es 10°C. Esto está basado en observaciones experimentales de *B. stearothermophilus*. Si se asume que Z = 10°C, F se escribe como Fo. (8)

Fo es el tiempo requerido a cualquier temperatura que es equivalente a un efecto de esterilización a 121°C. (1)

La ecuación usada para determinar el logaritmo de la reducción microbiana se deriva como sigue:

$$Dt = \frac{t}{(\log N_i - \log N_f)}$$

t = tiempo de calentamiento a una temperatura específica
 N_i = número inicial de microorganismos
 N_f = número final de microorganismos (después de t)

Si t es el tiempo de exposición a una temperatura dada $t = F_T$

$$D_T = \frac{F_T}{(\log N_i - \log N_f)}$$

La velocidad de destrucción de la endotoxina a 250°C puede expresarse usando un valor $Z = 46.4^\circ\text{C}$ y un valor $D = 4.99$ minutos. El ciclo puede diseñarse utilizando el peor de los casos, situación donde los parámetros de tiempo mínimo y temperatura son definidos. Objetos estables al calor pueden tolerar los ciclos de despirogenización con temperaturas mayores a 250°C. Así, la letalidad del ciclo puede definirse sobre la base de que la inactivación de la endotoxina se basa en la carga de pirógenos y no la de m.o. El valor FH puede calcularse para un ciclo de despirogenización usando el valor general de F en la ecuación con referencia a una temperatura de 250°C. (8)

La siguiente fórmula puede usarse para establecer el valor FH mínimo del proceso:

$$FH = D_{170^\circ\text{C}} (\log a - \log b)$$

FH = letalidad mínima requerida ($Z = 20^\circ\text{C}$), expresada como el número de minutos equivalente al tiempo a 170°C al que debe exponerse el calor en el punto más frío de la carga.

b = nivel máximo aceptable para probabilidad de supervivencia.

a = carga de pirógenos por artículo.

$D_{170^\circ\text{C}}$ = tiempo para reducir la población de microorganismos más resistente encontrado en el producto en un 90%. (9)

El valor FH es la integración de la letalidad a una temperatura referencia de 170°C. Para calcularlo se asume que $D = 1.0$ minutos y $Z = 20^\circ\text{C}$. La velocidad de letalidad determina el incremento del efecto del calor letal obtenido a varias temperaturas usando el valor Z . El valor FH es derivado por integración de la velocidad letal con respecto al tiempo. El valor FH (el tiempo equivalente a la temperatura de referencia), acumula la letalidad total. Cuando se usan temperaturas distintas a 170°C el valor F se reporta como el tiempo equivalente del proceso a la temperatura de referencia de 170°C. (8)

$$F_t^Z = F_{170}^Z / L = FHL$$

F_t^Z = Tiempo equivalente a la temperatura dada a un valor Z específico

F_{170}^Z = Tiempo equivalente a 170°C con un valor Z específico.

Cuando Z = 20°C, es igual a FH

L = Velocidad letal

$$L = 10^{(T_0 - T_b) / z}$$

T_0 = Temperatura dentro del contenedor

T_b = Temperatura base de 170°C

El valor FH «250» determinado puede usarse para calcular el número de ciclos logarítmicos en cantidad de endotoxina reducidos por unidad (Ldec). Estos valores se calculan por integración de las curvas de calor de penetración-letalidad. El modelo fue determinado experimentalmente para alcanzar el nivel deseado de destrucción de endotoxina: (8)

$$L \text{ dec} = 6.065 (10^{-0.201} \times FH^{-1})$$

6.065 = Parámetro de linealización (constante de temperatura de referencia a 250°C) para la curva de destrucción por calor seco de la endotoxina de *E. coli*

FH = Velocidad letal a 250°C para calor latente. (8)

2.4.2 TERMOPARES

Un termopar es un sensor de temperatura simple, confiable y versátil construido uniendo dos alambres de composición distinta formando un ensamble. Cuando un termopar se conecta a un sistema de referencia y medición, la salida indicada es una función única de la temperatura de ensamble. (8)

Los termopares son los sensores más satisfactorios para los estudios de penetración de calor y distribución de temperatura durante la validación. (8)

La temperatura es la propiedad más frecuentemente usada en los procesos industriales, y los termopares los sensores más usados cuando se registra o se controla la temperatura. La principal razón para elegir los termopares es que son más confiables y menos caros que otros sensores de temperatura que tienen salida eléctrica. Su exactitud debe ser $\pm 0.5^\circ\text{C}$. (8)

Es práctica común utilizar los termopares teniendo en cuenta solo el rango de temperatura en el que actúan, sin pensar en las características fisicoquímicas de la atmósfera o medio donde deberán actuar. No solo es necesario pensar en el comportamiento de los termoelementos cuando trabajen en ambientes adversos, es preciso también analizar la respuesta en estos medios de la cubierta protectora y de los aislantes de relleno (Tabla VI). (21)

TIPO	COMPOSICION	CARACTERISTICAS
T	Cu(+) constantan(-)	Resistente a la corrosión. Contacto con aire o atmósfera oxidante T < 370°C. A vacío, atmósfera oxidante, reductora o inerte de -200 a 370°C.
J	Fe(+) constantan(-)	Atmósfera oxidante, reductora o vacío, de 0 a 760°C.
E	Ni10Cr(+) constantan(-)	Atmósfera oxidante o inerte de 200 a 900°C. Atmósfera reductora, oxidante y reductora, ligeramente oxidante y vacío igual al tipo K.
K	Ni10Cr(+) Ni5AlSi	Señal termoelectrónica mayor. Atmósfera oxidante o inerte de -200 a 1260°C.
R	Pt13Rh(+) Pt(-)	Uso continuo en atmósfera oxidante o inerte.
S	Pt10Rh(+) Pt(-)	Pt susceptible de contaminarse lo que reduce la señal termoelectrónica. De 0 a 1480°C.
B	Pt30Rh(+) Pt6Rh(-)	Atmósfera oxidante o inerte de 870 a 1700°C.

Tabla VI. Clasificación de los termopares. (21)

Además de una buena elección del termopar idóneo para unas condiciones determinadas es necesario dotarlos de una protección auxiliar, necesitando de una vaina o tubo que la proteja doblemente, frente a la corrosión y las agresiones fisicomecánicas. Se clasifican en:

- a) Tubos protectores mecánicos (aceros al C).
- b) Contenedores especiales (cuando el termopar está sujeto a altas presiones), por ejemplo tubos cerámicos, tubos mixtos metal-cerámicos. (21)

Otro dato interesante en la protección de los termopares es el aislamiento de los hilos. Los materiales aislantes deben poseer una serie de características, dependiendo del tipo de vaina, termopar y rango de temperatura de trabajo. A temperaturas bajas tienen un buen comportamiento el algodón, nylon, teflón, poliamida, polivinilo y algunas mezclas (teflón/fibra de vidrio o fibra de vidrio/barniz de silicona), frente a agentes agresivos de tipo físico y químico, en campos de temperaturas máximas, que va desde los 95°C para el algodón a los 540°C de la mezcla fibra de vidrio/barniz de silicona. (21)

Es preciso, a la hora de seleccionar un termopar, para un servicio determinado, hacerlo en función del rango de temperatura y la atmósfera de

trabajo donde va a operar, así como la protección ideal para los termoelementos, para evitar su deterioro y consecuente falta de fiabilidad en la medida y reducción del tiempo de duración del termopar. (21)

En una instalación típica de termopares, las 3 fuentes principales de error son: los sensores, el circuito que conecta los termopares al sistema de medición y el sistema de medición. (21)

Los termopares usados durante una validación deben calibrarse antes y después de cada uso, lo que asegura la operación correcta del sistema. Todos los sensores deben calibrarse al punto de hielo: 0.0°C, así como a las temperaturas máxima y mínima que van a medirse. (21)

La temperatura de operación típica en los hornos de aire caliente está cerca de los 200°C y para la despirogenización sobre 300°C. Para la validación de estos procesos los termopares deben calibrarse a una temperatura cercana a la temperatura normal de operación. Si se usa el punto de hielo como segunda temperatura y se aplica regresión lineal el máximo error relativo es $\pm 0.3^\circ\text{C}$ entre 0.0°C y 200.0°C o $\pm 0.5^\circ\text{C}$ entre 0.0°C y 300°C. Este nivel de error es normalmente aceptable en estos procesos, y se vuelve mucho menor cerca de la máxima temperatura de calibración, que es la temperatura normal de operación. (21)

2.4.3 EQUIPO Y MATERIAL PARA LA MEDICION DE TEMPERATURA

a) Termopares:

Se usan termopares tipo T y J. La aislación más común para trabajos de alta temperatura es DuPont's Kapton-H. Esta se considera suficiente para la despirogenización a 350°C. (8)

b) Resistencias detectoras de la temperatura:

La resistencia detectora de temperatura (RTD) es utilizada para la calibración del equipo medidor de temperatura usado en la validación. El RTD mide centésimas de °C y los termopares tienen un nivel de sensibilidad de décimas de °C. El RTD es más estable que los termopares. (8)

c) Registrador de temperatura:

Un equipo que tome muchos puntos es comúnmente usado durante los estudios de validación, éste anota las temperaturas tomadas por los termopares. El registrador toma la salida del voltaje tomado por el termopar y lo convierte en un valor numérico. (8)

2.5 VALIDACION DE LA ESTERILIZACION POR CALOR SECO

La validación del proceso de esterilización por calor seco incluye pruebas físicas y biológicas. El procedimiento puede ser:

- a) Calificación de la instalación
- b) Calibración
- c) Calificación del equipo
- d) Validación microbiológica del proceso
- e) Revisión de los datos de la prueba
- f) Certificación final de la documentación. (9)

Para procesos diseñados únicamente para la esterilización, se establecen los parámetros del ciclo basándose en la biocarga y sus características de resistencia térmica. El ciclo se diseña para asegurar que la probabilidad de supervivencia de la microflora nativa no es mayor que una unidad contaminada en un millón de unidades de producto (10^{-6} , probabilidad de no estéril). (17)

También puede usarse el método de muerte total, que asegura la esterilización con una probabilidad mayor a 10^{-6} unidades no estériles. (9)

2.5.1 CALIFICACION DE LA INSTALACION

La calificación de la instalación compara el sistema contra las especificaciones de manufactura de la instalación:

- a) Confirma que el esterilizador está instalado propiamente, todas sus desviaciones, utilidades y conexiones contrastan con las recomendaciones del fabricante y contra las anotaciones de las modificaciones hechas a la unidad.
- b) Ofrece información pertinente acerca del esterilizador: órdenes de compra, cotizaciones, especificaciones, cambios en el equipo.
- c) Se deben evaluar procedimientos estándares de operación, programa de mantenimiento preventivo, procedimiento de sanitización y calibración.
- d) Identificar y localizar la unidad en planos del área donde se encuentra, número y serie del modelo, número de identificación en el departamento y/o corporación. (8)

Después de la calificación se debe verificar la propia instalación: la calificación de la operación, pues es necesario determinar que el esterilizador funciona como está indicado:

- a) Los componentes del sistema aseguran los rangos de operación como determinan las especificaciones.
- b) Identificación de controladores de temperatura, cronómetros de ciclo, funcionamiento de las puertas, calentadores, ventiladores y rolos de enfriamiento, así como la ejecución de la operación realizada y sus rangos determinados.

2.5.2 CALIBRACION

Todo el equipo usado para la validación y el equipo de producción involucrado debe calibrarse. El período de tiempo entre calibraciones se determina por la estabilidad del instrumento y la exactitud requerida. Todos los instrumentos calibrados deben ser numerados, registrados y referidos. Se sugiere anotar la fecha de la próxima calibración. (8)

2.5.3 CALIFICACION DEL EQUIPO

2.5.3.1 Estudio cámara vacía

La prueba inicial de la validación es con la cámara vacía con el propósito de observar como es la distribución de la temperatura. Las características termodinámicas del esterilizador vacío son descritas en un perfil de distribución de la temperatura. Este sirve para localizar los lugares calientes y fríos en el esterilizador por mapeo de la temperatura de varios puntos en la cámara. El perfil de temperatura se obtiene colocando mínimo 10 termopares distribuidos en el esterilizador vacío, evitando contacto con las superficies sólidas. Un buen perfil puede demostrar temperaturas uniformes a través del esterilizador. (8)

Si el perfil de distribución de temperatura en la cámara vacía no es aceptable, el esterilizador es ajustado, modificado o reparado y el estudio debe repetirse. Si el perfil es aceptable se repite tres veces consecutivas el estudio para demostrar la reproducibilidad del ciclo. Un rango típico aceptable en temperatura es de $\pm 15^{\circ}\text{C}$ y puede aceptarse hasta de 25°C . (1,6)

2.5.3.2 Estudio cámara con carga

Como en las pruebas de cámara vacía, los estudios de validación con carga parcial o total de la cámara se incluyen en las pruebas de distribución de calor usando termopares colocados cerca de los sensores de temperatura. Los termopares pueden posicionarse en algunos de los puntos usados para el estudio con cámara vacía. Al colocarlos debe evitarse contacto con alguna superficie sólida. Este estudio determina el efecto de la carga sobre la distribución de calor en la cámara. (8)

Los estudios de penetración del calor pueden monitorearse simultáneamente con los estudios de distribución de calor. La información de penetración es crítica en cámara parcialmente cargada o llena, dado que los materiales se calientan a diferente velocidad. La velocidad de penetración depende del tipo de material de la carga, de su configuración y la uniformidad de distribución de la temperatura. Los datos para la penetración de calor se obtienen colocando los termopares en el interior del envase, asegurando el contacto con la

superficie (el termopar puede no estar leyendo la temperatura del aire, puede leer la temperatura de la superficie). Es importante anotar la velocidad con que asciende la temperatura y con la que desciende, en el aire y en el producto. (8)

Para la validación se emplean cargas representativas. Idealmente cada tamaño y tipo de material debe probarse por estudios de penetración. Cargas representativas pueden incluir artículos de tamaños extremos o bien donde es muy difícil la penetración del calor. Un diagrama detallado de la localización de los termopares debe acompañar todos los datos de temperatura. Es necesario identificar las áreas calientes y frías de cada carga. Las primeras son importantes para objetos lábiles al calor y las segundas para monitorear el aseguramiento de la esterilización y/o despirogenización. (8)

Si el perfil de temperatura es aceptable se replican tres corridas consecutivas para demostrar la esterilidad de la carga y la reproducibilidad del ciclo. La replicación de las corridas verifica que el valor FH mínimo requerido es logrado dentro de la porción más fría de la carga. (8)

2.5.4 VALIDACION MICROBIOLOGICA DEL PROCESO

El reto biológico puede hacerse separado o junto con el estudio de penetración de calor. El bioindicador se coloca adyacente a los objetos o dentro de ellos, junto con los termopares. El estudio demuestra la letalidad obtenida por desafío del ciclo con un m.o. (*B.subtilis*) o endotoxina (*E.coli*). (8)

En los ciclos de despirogenización parece no haber un consenso general del nivel usado de bioindicador. Concentraciones citadas en la literatura tienen rangos de 100 a 10 000 ng (500 a 50 000 UE). (4)

Si en el estudio hay esporas supervivientes o endotoxina residual, la cantidad puede cuantificarse y analizarse con respecto a los valores de FH y Ldec. Los resultados de este estudio confirman que la esterilización o despirogenización son efectivos. (8)

2.5.4.1 Indicador biológico

El bioindicador para la esterilización por calor seco es una preparación de esporas viables obtenidas a partir de un cultivo derivado de una cepa específica de *Bacillus subtilis* subespecie niger, impregnadas en una tira de papel, empaçadas individualmente en un recipiente adecuado permeable al aire caliente, caracterizado en su resistencia a la esterilización por calor seco. El número de esporas va de 10^4 a 10^9 . (6, 19)

2.5.5 REVISION DE LOS DATOS DE LA PRUEBA

Después de realizadas las pruebas se obtienen una gran cantidad de datos los cuales deben ser procesados para entender el comportamiento del

proceso. Por lo cual se recomienda realizar gráficas y tablas relacionando el tiempo y la temperatura, calcular el FH y darle un tratamiento estadístico a los datos obtenidos.

2.5.5.1 Análisis de varianza

El análisis de varianza es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada uno de los cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total. (22)

Se aplica ampliamente en la investigación, pues está íntimamente relacionado con el diseño experimental. La relación entre estos dos tópicos se puede resumir diciendo que cuando se diseña un experimento el cual queremos someter a un análisis, los investigadores pueden, antes de llevar a cabo su investigación, identificar aquellas fuentes de variación que consideran importantes y pueden seleccionar un modelo que les permita medir la extensión de la contribución de esas fuentes de variación total. (22)

En este estudio utilizaremos el análisis de varianza de 2 factores en el diseño completamente aleatorio. (Anexo I)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La operación aséptica ha sido y seguirá siendo una operación crítica desde cualquier punto de vista. (23)

Los productos estériles poseen propiedades únicas entre todas las formas de dosificación, tales como ser libres de pirógenos, microorganismos y partículas, y poseer estándares extremadamente altos de pureza y calidad. (4)

Además es la única forma farmacéutica que se inyecta a través de la piel o membranas mucosas a los compartimientos internos del cuerpo. Debido a que atraviesan la primera línea de defensa del organismo deben estar libres de contaminación microbiana y componentes tóxicos. Todos los componentes y procesos involucrados en la preparación de estos productos deben elegirse y diseñarse para eliminar en el mayor grado la contaminación de todo tipo: física, química o microbiológica. (5)

El proceso de esterilización es un término absoluto que significa la destrucción o eliminación de todas las formas de vida. En la realidad la esterilidad es relativamente imposible de probar, por ello deben usarse las leyes de la probabilidad para asegurar que la menor cantidad de cualquier forma de vida sobrevive al tratamiento. (7)

Las Good Manufacturing Practices y la Parenteral Drug Administration en sus Monografías Técnicas han recomendado a través de la FDA que debe calificarse el diseño del equipo y validarse el proceso, confirmándolo con datos reproducibles. De ahí la necesidad de calificar los equipos utilizados (en este caso el Horno Reinhardt), para así poder demostrar de manera documentada que la esterilización y despirogenización efectuada cumple con las especificaciones predeterminadas por el fabricante y con los atributos de calidad necesarios exigidos por FDA.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar un Plan de Validación que certifique que el procedimiento de esterilización/despirogenización efectuado en el Horno Reinhardt del Departamento de Veterinaria Inyectables de la Planta Bayer de México, cumple con las especificaciones recomendadas por FDA, para su empleo rutinario en la manufactura de productos inyectables.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1 Demostrar que el ciclo de esterilización / despirogenización utilizando calor seco en el Horno Reinhardt es efectivo, confiable y reproducible bajo las condiciones de uso del equipo.

4.2.1.1 Calificar el equipo.

4.2.1.2 Realizar el estudio de distribución de calor con cámara vacía.

4.2.1.3 Efectuar el estudio de distribución de calor con cámara llena (frasco de vidrio, retapa de aluminio).

4.2.1.4 Confirmar la eficiencia de la esterilización / despirogenización usando un indicador biológico (endotoxina).

4.2.1.5 Determinar el valor FH y realizar el análisis de varianza.

4.2.2 Corroborar con pruebas de esterilidad y pirógenos la eficacia de la esterilización y despirogenización en producto terminado.

5. HIPOTESIS

Al efectuar la validación del proceso de esterilización / despirogenización en el Homo, se obtendrá la comprobación documentada de que se conoce el proceso en su totalidad.

De esta manera se mantendrá controlada la esterilización / despirogenización, garantizando una reproducibilidad en la calidad de producto y confiabilidad del proceso realizado en el Homo Reinhardt.

6. MATERIAL Y METODO

6.1 MATERIALES

- a) Esterilizador de aire caliente FA Reinhardt.
- b) Central de esterilización.
- c) Equipo Kaye
 - Registrador con microprocesador Kaye Digistrip 45 plus
 - Patrón de temperatura RTD inteligente, Número de serie 40676, Certificado por el CENAM, Noviembre 1994
 - Baño de pozo seco de temperatura constante Kaye HTR 400
 - Interfase de comunicación RS-232
 - Computadora personal con procesador 80486
 - Software de comunicación para Digistrip 4S-plus versión 4-B
 - Dieciséis termopares tipo T con cubierta de teflón para medios secos
 - Año de fabricación 1994
 - Los resultados se registran como tablas y gráficas
- d) Indicador biológico
 - Endotoxina: *Escherichia coli* (CSE)
 - Marca: Bio Whittaker
 - Lote: 3L012C
 - Concentración: 10 UE/ng
 - Caducidad: 11.06.97
 - Concentración de reto: 5 000 UE
 - Limulus polyphemus* (LAL)
 - Lote: 3L1680
 - Marca: Bio Whittaker
 - Sensibilidad: 0.06 UE/ml
 - Caducidad: 22.06.96
- e) Frasco de vidrio de:
 - 25 ml
 - 50 ml
 - 100 ml
 - 250 ml
 - 500 ml
- f) Casquillo de aluminio

6.2 METODOLOGIA

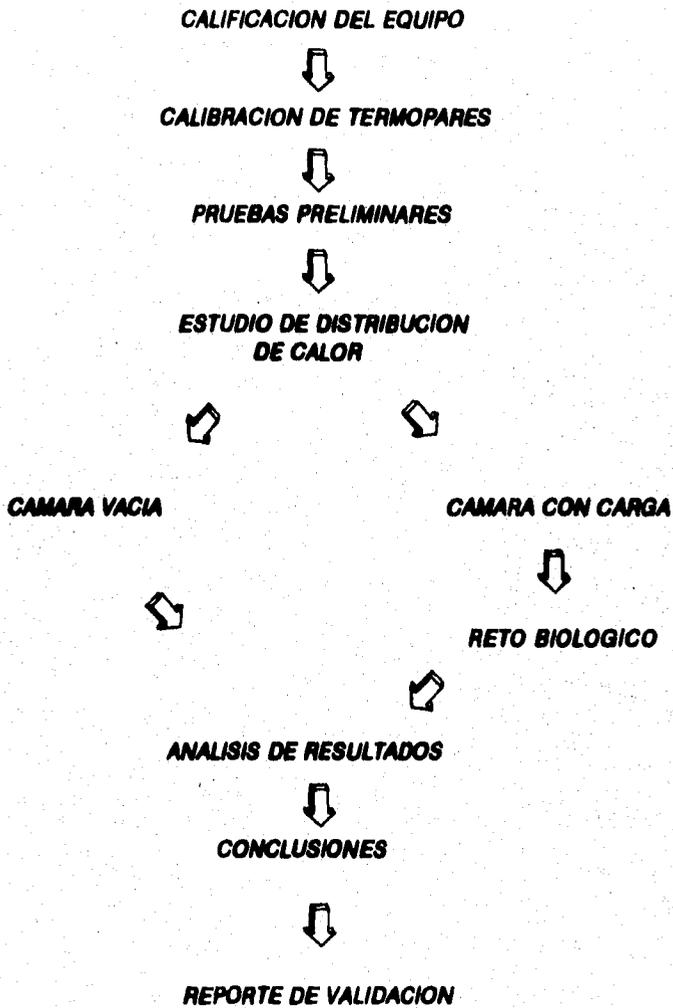


Figura 8. Diagrama de flujo de la validación de horno

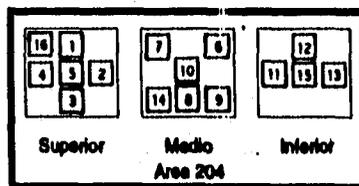


Diagrama 2

- h) En base a los resultados de ambas pruebas, elegir los lugares con la temperatura más alta y más baja para el estudio de distribución de calor en cámara vacía.

6.2.4 DISTRIBUCION DE CALOR

6.2.4.1 Cámara vacía

- a) Colocar los 16 termopares como se indica en el diagrama 3, cuidando que no haya contacto de éstos con las paredes de la cámara (en 4 canastillas de acero inoxidable).

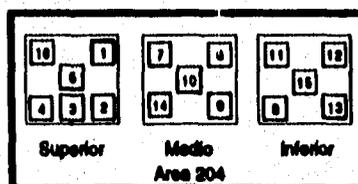
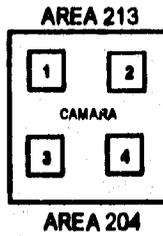


Diagrama 3

- b) El termopar 16 se coloca junto al sensor del controlador.
 c) Efectuar el ciclo de despirogenización.
 d) Registrar la temperatura durante todo el ciclo cada minuto.
 e) Determinar cómo es la distribución de calor en la cámara (homogénea o heterogénea).
 f) Realizar por triplicado este procedimiento.

6.2.4.2 Cámara con carga

- a) Colocar los 16 termopares en la cámara con carga, dentro de los envases, sujetándolos con alambre de cobre, evitando el contacto con las paredes
 b) A cada patrón de carga le corresponde un arreglo distinto de termopares:



1. Canastilla 1
2. Canastilla 2
3. Canastilla 3
4. Canastilla 4

Nota: Los niveles indican el acomodo de las charolas en las canastillas.

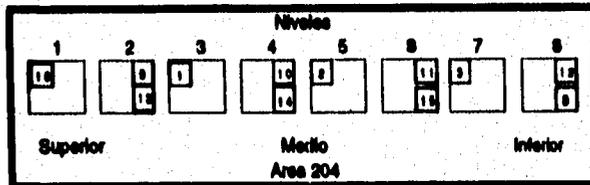


Diagrama 4. Frasco de 25 ml.

Los termopares 4, 5, 6 y 7 se colocan en charolas acomodadas en el espacio vacío (donde iría la canastilla 3).

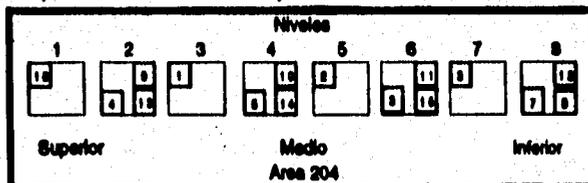


Diagrama 5. Frasco de 50 ml.

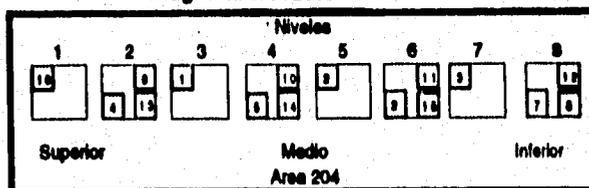


Diagrama 6. Frasco de 100 ml.

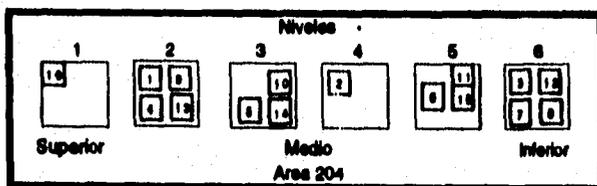


Diagrama 7. Frasco de 250 ml.

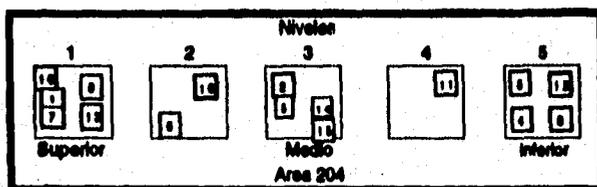


Diagrama 8. Frasco de 500 ml.

- c) Colocar el termopar 16 en el punto frío determinado en el estudio de cámara vacía.
- d) Efectuar el ciclo de despirogenización.
- e) Registrar la temperatura durante todo el ciclo cada minuto.
- f) Determinar cómo es la distribución de calor en la cámara con carga (homogénea o heterogénea).
- g) Realizar por triplicado el procedimiento para cada patrón de carga.

6.2.5 RETO BIOLÓGICO

- a) Colocar el indicador biológico dentro de los envases, junto a los termopares utilizados en la prueba de distribución de calor.
- b) Determinar la presencia de endotoxina, después de realizada la corrida.

6.2.8 PATRONES DE CARGA

- * Frasco de vidrio de 25 ml y casquillo de aluminio
 - * Frasco de vidrio de 50 ml
 - * Frasco de vidrio de 100 ml
 - * Frasco de vidrio de 250 ml
 - * Frasco de vidrio de 500 ml
- (Todas corresponden a cargas máximas, Anexo II)

6.2.7 NUMERO DE CORRIDAS

18 corridas en total, de las cuales 15 requieren de análisis microbiológico (Tabla VII).

ESTUDIO	REPETICIONES
Distribución de calor (cámara vacía)	3
Distribución de calor y Reto biológico	
* Frasco de 25 ml	3
* Frasco de 50 ml	3
* Frasco de 100 ml	3
* Frasco de 250 ml	3
* Frasco de 500 ml	3
Total de corridas	18

Tabla VII. Número de corridas a realizar

6.2.8 CRITERIOS DE ACEPTACION

Al realizar los estudios de validación en el horno este debe cumplir con las siguientes especificaciones (Tabla VIII).

1. DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA VACIA a) Distribución homogénea de calor en cámara vacía b) Punto frío 2. DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA CON CARGA a) Distribución homogénea de calor en cámara con carga b) Punto frío c) FH 3. RETO BIOLOGICO	a) Se sugiere que la diferencia de temperatura entre el punto frío y el resto de la cámara sea $\leq 25^{\circ}\text{C}$ b) Punto frío $\geq 225^{\circ}\text{C}$ a) Se sugiere que la diferencia de temperatura entre el punto frío y el resto de la cámara sea $\leq 25^{\circ}\text{C}$ b) Punto frío $\geq 225^{\circ}\text{C}$ c) FH ≥ 8.4 a) Ningún indicador biológico con endotoxina deberá dar resultado positivo
---	--

Tabla VIII. Criterios de aceptación para horno.

7. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

7.1 CALIFICACION DEL EQUIPO

HORNO FA REINHARDT

- Número de fabricación: 6593
- Año de fabricación: 1983
- Dimensiones (cámara): 195 cm fondo, 156 cm alto, 168 cm ancho.
- Espacio útil: 4.81 m³
- Tensión de conexión: 220/127 volt, corriente alterna
- Frecuencia: 60 Hz
- Capacidad total: 67 KW: 60 KW para la calefacción, 3 KW para el motor del ventilador aire fresco y 4 KW para el motor del ventilador de circulación
- Margen de temperatura: 50-350°C
- Requerimiento de aire a presión: 4 bar aprox. Pre-regulador libre de aceite y condensación
- Peso de alimentación: 1 300 Kg: 600 Kg vidrio y 700 Kg acero
- Empresa: Bayer de México
- Localización: Dpto. Veterinaria Inyectables. Area 204/213
- Número de máquina: 30
- Cuenta con 6 termopares tipo J

El equipo se encuentra en buenas condiciones de operación.

CENTRAL DE ESTERILIZACION

La cámara para la esterilización mediante aire caliente tiene calefacción directa en el techo, ventilación por inyección bilateral, circulación vertical, artificial de aire, instalación de aire fresco incorporada para esterilizar a temperatura de trabajo hasta un máximo de 350°C. Regulación de la temperatura automático.

7.2 CAMARA VACIA

Al realizar las pruebas preliminares se detectaron los lugares con la temperatura más alta y más baja en la cámara, estableciéndose el acomodo definitivo de termopares, como se indica en el diagrama 3 de la metodología, para realizar el estudio de distribución de calor en cámara vacía.

En el estudio de cámara vacía los puntos más fríos se localizaron en las esquinas y los más calientes en el centro de la misma, debido a la localización de las resistencias y el ventilador que causan la convección forzada del aire caliente, haciendo de esta manera más caliente la parte central de la cámara. En todos los puntos muestreados se alcanzó la temperatura de despirogenización y se tuvo una distribución de calor homogénea (Figura 9).

Al realizar el análisis estadístico de este estudio se observa que hay diferencia significativa entre los distintos tiempos y hay efecto del tiempo sobre la temperatura, puesto que la temperatura no permanece constante al distribuirse el calor en la cámara durante todo el tiempo del ciclo. Hay diferencia significativa entre los termopares y efecto del termopar sobre la temperatura debido a que están localizados en diferentes puntos de la cámara. Hay diferencia significativa entre las medias de interacción de tiempo y termopar, y efecto de las mismas sobre la temperatura. (Tabla IX).

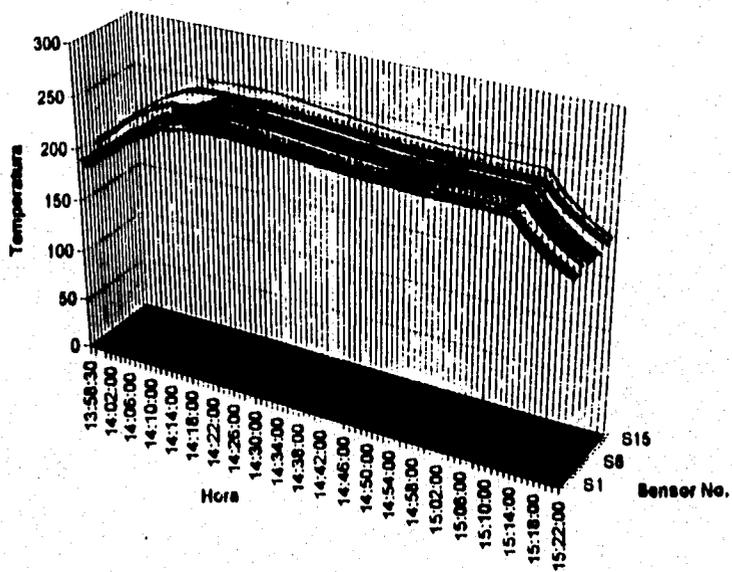


Figura 9. Gráfica representativa del estudio de distribución de calor en cámara vacía (corrida 1)

ANÁLISIS DE VARIANZA. CAMARA VACIA

Ho1: Los efectos de los tiempos son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable tiempo.

Ha1: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable tiempo. Hay efecto del tiempo sobre la temperatura.

Ho2: Los efectos de los termopares son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable termopar.

Ha2: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable termopar. Hay efecto del termopar sobre la temperatura.

Ho3: No hay diferencia entre las distintas interacciones tiempo-termopar, ni efecto de las mismas sobre la temperatura.

Ha3: Hay diferencia significativa entre las interacciones tiempo-termopar y efecto de las mismas sobre la temperatura.

Fuente	gl	Suma de Cuadrados	Varianza	Coeficiente de Regresión	F _{cal}
Tiempo	59	56761	962.05	389.14	1.84
Termopar	15	50434	3362.31	1360.04	1.92
Interacción	885	5874	6.63	2.68	1.51
Subtotal	959	113070			
Error residual	1920	4746	2.47		
Total	2879	117817			

Tabla IX. Análisis de varianza de 2 factores del estudio de distribución de calor en cámara vacía

Si $F_{cal} < F_{tab}$. Ho se acepta

F_{tab} con $\alpha = 0.05$

CONCLUSION

Ho1: Se rechaza

Ho2: Se rechaza

Ho3: Se rechaza

7.3 FRASCO DE 25 ml.

En la carga de frasco ámbar de 25 ml y casquillo se observó una distribución de calor homogénea en la segunda y tercera corridas, en éstas el punto más frío durante la última cuarta parte del ciclo fue el mismo que para la cámara vacía. Todos los termopares alcanzaron 225°C durante al menos 30 minutos (Figura 10).

En la primera corrida a los 30 minutos del ciclo la diferencia de temperatura fue de 47.2°C, por lo tanto la distribución de calor es heterogénea. La diferencia de temperatura de 25°C se alcanzó a los 46 minutos. El punto más frío se detectó en el termopar 6 (ver diagrama 4). Todos los termopares alcanzaron 225°C, dos de ellos menos de 30 minutos.

Los valores de FH obtenidos son superiores al reportado en tablas: 8.4 para 60 minutos a 210°C, con un valor $z = 46.4$ y $D = 4.99$ minutos. Por lo tanto termodinámicamente el proceso tiene un comportamiento adecuado (Tabla X).

En el análisis estadístico se observa que hay diferencia significativa entre los distintos tiempos y hay efecto del tiempo sobre la temperatura. Hay diferencia significativa entre los termopares y efecto del termopar sobre la temperatura. No hay diferencia significativa entre las medias de interacción de termopar y tiempo. (Tabla XI).

Todas las endotoxinas dieron resultado negativo.

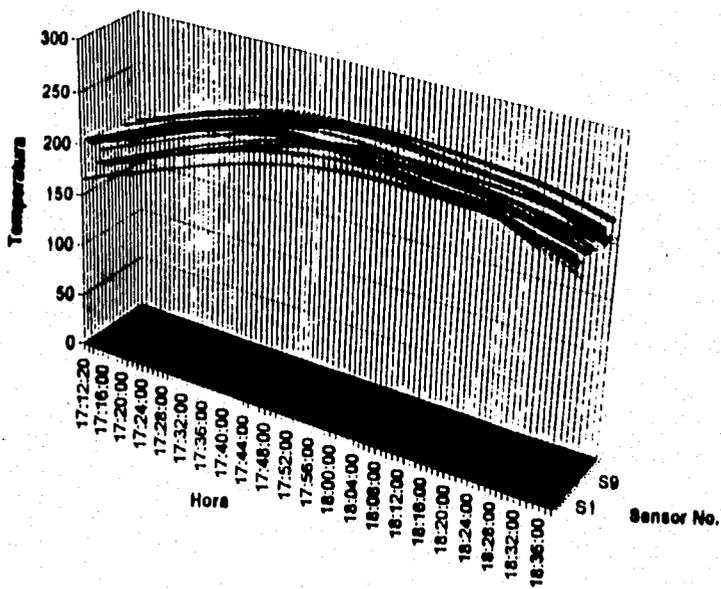


Figura 10. Gráfica representativa del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 25 ml (corrida 2)

**VALORES FH
FRASCO AMBAR DE 25 ml**

TEMPERATURA	TEMPERATURA	TEMPERATURA	TEMPERATURA
1	130	93	117
2	304	227	265
3	246	186	275
4	238	154	254
5	201	90	196
6	60	139	348
7	133	224	399
8	437	334	533
9	252	232	353
10	563	380	319
11	714	374	755
12	522	363	577
13	300	258	363
14	369	316	333
15	538	299	569
16	285	243	260

Tabla X. FH acumulado del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 25 ml.

ANALISIS DE VARIANZA. FRASCO DE 25 ml.

Ho1: Los efectos de los tiempos son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable tiempo.

Ha1: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable tiempo. Hay efecto del tiempo sobre la temperatura.

Ho2: Los efectos de los termopares son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable termopar.

Ha2: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable termopar. Hay efecto del termopar sobre la temperatura.

Ho3: No hay diferencia entre las distintas interacciones tiempo-termopar, ni efecto de las mismas sobre la temperatura.

Ha3: Hay diferencia significativa entre las interacciones tiempo-termopar y efecto de las mismas sobre la temperatura.

Tiempo	59	484797	8216.91	99.22	1.84
Termopar	15	142355	9490.35	114.6	1.92
Interacción	885	42811	48.37	0.58	1.51
Subtotal	959	669985			
Error residual	1920	158998	82.61		
Total	2879	826981			

Tabla XI. Análisis de varianza de 2 factores del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 25 ml.

Si $F_{\text{cal.}} < F_{\text{tab.}}$. Ho se acepta

$F_{\text{tab.}}$ con $\alpha = 0.05$

CONCLUSION

Ho1: Se rechaza

Ho2: Se rechaza

Ho3: Se acepta

7.4 FRASCO DE 50 ml.

El patrón de carga frasco ámber de 50 ml presentó una distribución de calor heterogénea en las 2 primeras corridas, y homogénea en la tercera, dado que en la primer corrida la diferencia de temperatura de 25°C se alcanzó a los 44 minutos de transcurrido el ciclo, y en la segunda a los 35 minutos. Todos los termopares alcanzaron 225°C por lo menos durante 30 minutos. El lugar más frío en cada corrida fue: termopar 1 (primera y segunda corrida) y termopar 13 (tercera corrida) (ver diagrama 5). El punto más frío al finalizar el ciclo en la primer corrida fue el termopar 3, y en la segunda y tercera corrida el termopar 6 (ver diagrama 5) (Figura 11).

De acuerdo al estudio termodinámico los valores de FH cumplen con especificaciones (Tabla XII).

En el estudio estadístico se observan los mismos resultados que para el frasco de 25 ml (Tabla XIII).

Todas las endotoxinas utilizadas dieron resultado negativo.

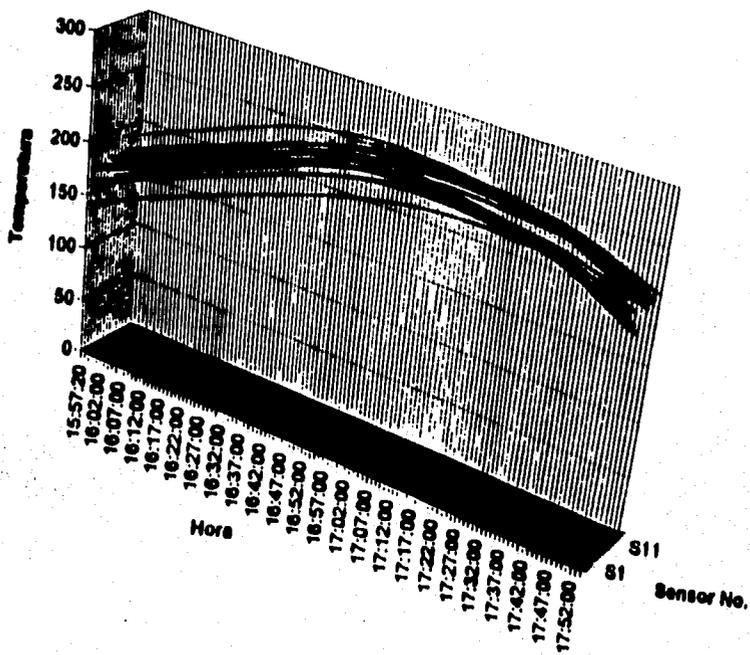


Figura 11. Gráfica representativa del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 50 m³ (corrida 2)

**VALORES FH
FRASCO AMBAR DE 50 ml**

1	108	108	158
2	154	233	199
3	98	212	202
4	135	142	107
5	202	149	160
6	224	172	180
7	184	182	152
8	213	195	110
9	175	181	152
10	280	261	220
11	338	347	253
12	285	225	199
13	138	146	93
14	221	214	131
15	227	213	104
16	125	126	105

Tabla XII. FH acumulado del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 50 ml.

ANALISIS DE VARIANZA. FRASCO DE 50 ml.

Ho1: Los efectos de los tiempos son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable tiempo.

Ha1: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable tiempo. Hay efecto del tiempo sobre la temperatura.

Ho2: Los efectos de los termopares son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable termopar.

Ha2: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable termopar. Hay efecto del termopar sobre la temperatura.

Ho3: No hay diferencia entre las distintas interacciones tiempo-termopar, ni efecto de las mismas sobre la temperatura.

Ha3: Hay diferencia significativa entre las interacciones tiempo-termopar y efecto de las mismas sobre la temperatura.

Tiempo	59	136780	2318.31	59.64	1.64
Termopar	15	89760	5984.02	153.96	1.92
Interacción	885	42432	47.94	1.23	1.51
Subtotal	959	2689973			
Error residual	1920	74821	38.86		
Total	2879	343595			

Tabla XIII. Análisis de varianza de 2 factores del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 50 ml.

Si $F_{\text{cal.}} < F_{\text{tab.}}$. Ho se acepta

$F_{\text{tab.}}$ con $\alpha = 0.05$

CONCLUSION

Ho1: Se rechaza

Ho2: Se rechaza

Ho3: Se acepta

7.5 FRASCO DE 100 ml.

Para el patrón de carga frasco de 100 ml se observa una distribución de calor homogénea en las tres repeticiones. Al finalizar el ciclo el lugar más frío en las corridas 1 y 3 fue el mismo que para la cámara vacía. Todos los termopares alcanzaron 225°C al menos 30 minutos, en las 3 corridas (Figura 12).

Los valores de FH corresponden a lo especificado (Tabla XIV).

Estadísticamente los resultados son los mismos que para el frasco de 25 ml (Tabla XV).

Todas las endotoxinas dieron resultado negativo.

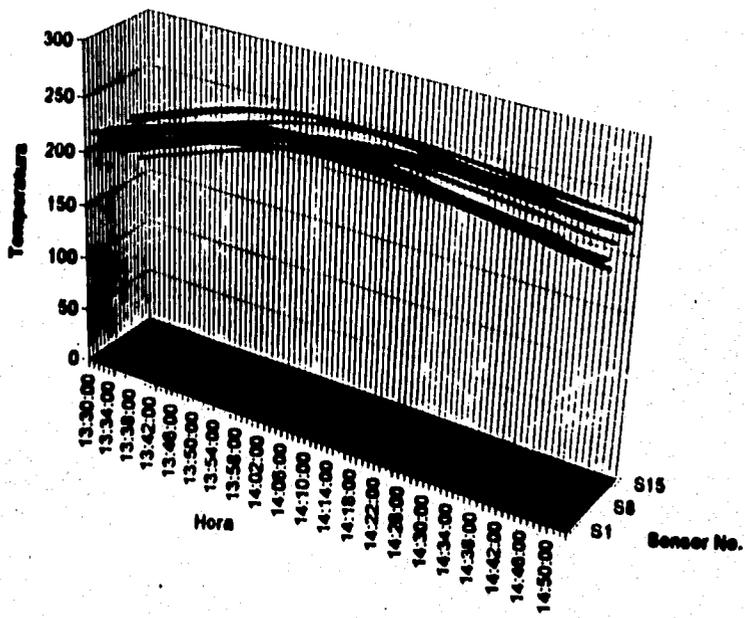


Figura 12. Gráfica representativa del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 100 ml (corrida 2)

**VALORES FH
FRASCO AMBAR DE 100 ml**

1	153	139	100
2	191	140	196
3	176	191	196
4	99	151	139
5	106	213	174
6	161	297	178
7	123	280	120
8	128	201	125
9	149	183	123
10	207	255	159
11	239	332	217
12	186	262	149
13	80	269	142
14	125	167	100
15	136	301	208
16	109	118	105

Tabla XIV. FH acumulado del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 100 ml.

ANALISIS DE VARIANZA. FRASCO DE 100 ml.

Ho1: Los efectos de los tiempos son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable tiempo.

Ha1: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable tiempo. Hay efecto del tiempo sobre la temperatura.

Ho2: Los efectos de los termopares son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable termopar.

Ha2: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable termopar. Hay efecto del termopar sobre la temperatura.

Ho3: No hay diferencia entre las distintas interacciones tiempo-termopar, ni efecto de las mismas sobre la temperatura.

Ha3: Hay diferencia significativa entre las interacciones tiempo-termopar y efecto de las mismas sobre la temperatura.

Tiempo	59	94238	1597.25	20.58	1.64
Termopar	15	55298	3686.54	47.51	1.92
Interacción	885	38521	43.52	0.56	1.51
Subtotal	959	188058			
Error residual	1920	148958	77.58		
Total	2879	337014			

Tabla XV. Análisis de varianza de 2 factores del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 100 ml.

Si $F_{\text{cal.}} < F_{\text{tab.}}$ Ho se acepta

$F_{\text{tab.}}$ con $\alpha = 0.05$

CONCLUSION

Ho1: Se rechaza

Ho2: Se rechaza

Ho3: Se acepta

7.6 FRASCO DE 250 ml.

En el patrón de carga de frasco ámbar de 250 ml la distribución de calor fue heterogénea en las 3 repeticiones. El ΔT de 25°C se alcanzó a los 36 minutos en la corrida 1, a los 32 minutos en la 2 y a los 49 minutos en la 3. Todos los termopares alcanzaron 225°C durante al menos 30 minutos en las 3 repeticiones. El lugar más frío para cada una de las corridas fue: termopar 13 (corrida 1), termopar 14 (corrida 2) y termopar 16 (corrida 3) (ver diagrama 7) (Figura 13).

De acuerdo a los valores obtenidos de FH el ciclo tiene un comportamiento termodinámico aceptable (Tabla XVI).

En el análisis de varianza se obtuvieron los mismos resultados que para el frasco de 25 ml (Tabla XVII).

Todas las endotoxinas dieron resultado negativo.

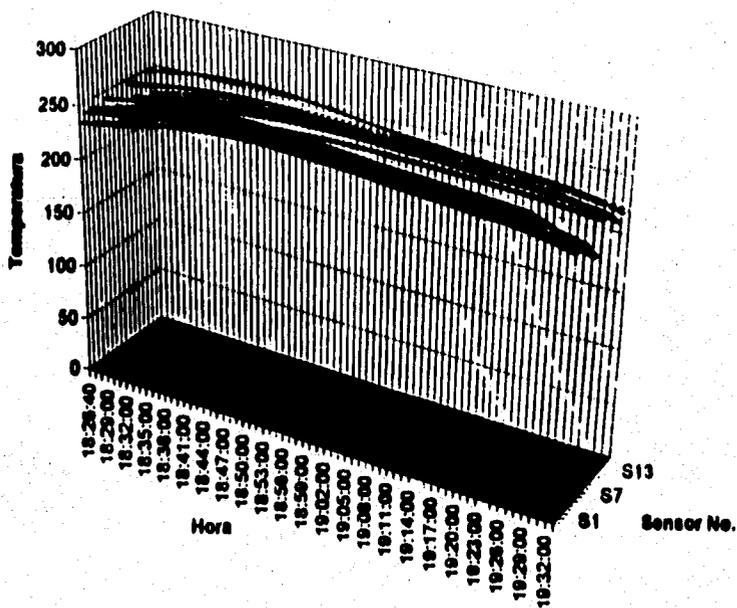


Figura 13. Gráfica representativa del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 250 ml (corrida 3)

**VALORES FH
FRASCO AMBAR DE 250 ml**

1	237	188	188
2	296	22	209
3	264	194	327
4	187	160	255
5	229	172	234
6	288	170	284
7	225	11	320
8	154	127	494
9	263	141	460
10	337	140	648
11	326	240	758
12	287	203	507
13	105	102	296
14	125	82	492
15	271	141	608
16	134	120	135

Tabla XVI. FH acumulado del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 250 ml.

ANALISIS DE VARIANZA. FRASCO DE 250 ml.

Ho1: Los efectos de los tiempos son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable tiempo.

Ha1: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable tiempo. Hay efecto del tiempo sobre la temperatura.

Ho2: Los efectos de los termopares son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable termopar.

Ha2: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable termopar. Hay efecto del termopar sobre la temperatura.

Ho3: No hay diferencia entre las distintas interacciones tiempo-termopar, ni efecto de las mismas sobre la temperatura.

Ha3: Hay diferencia significativa entre las interacciones tiempo-termopar y efecto de las mismas sobre la temperatura.

Tiempo	59	202428	3430.88	70.17	1.84
Termopar	15	116739	7762.65	159.19	1.92
Interacción	885	64347	72.7	1.48	1.51
Subtotal	959	383514			
Error residual	1920	933885	48.88		
Total	2879	4773779			

Tabla XVII. Análisis de varianza de 2 factores del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 250 ml.

Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$. Ho se acepta

F_{tab} con $\alpha = 0.05$

CONCLUSION

Ho1: Se rechaza

Ho2: Se rechaza

Ho3: Se acepta

7.7 FRASCO DE 500 ml.

La carga de frasco ámber de 500 ml presentó una distribución de calor homogénea en sus tres repeticiones, de igual forma el punto frío fue el mismo que en la cámara vacía (Figura 14).

El estudio termodinámico presenta un comportamiento adecuado de la cámara (Tabla XVIII).

En el análisis de varianza se tienen los mismos resultados que en el frasco de 25 ml (Tabla XIX).

Todas las endotoxinas dieron resultado negativo.

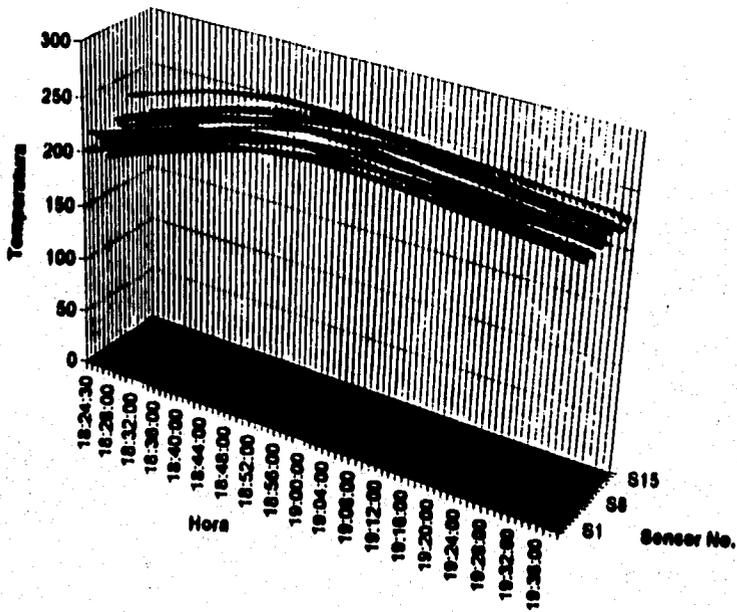


Figura 14. Gráfica representativa del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 500 ml (corrida 1)

**VALORES FH
FRASCO AMBAR DE 500 ml**

1	143	124	171
2	202	184	227
3	175	200	216
4	142	141	200
5	162	196	206
6	94	137	176
7	129	187	152
8	160	244	206
9	171	146	225
10	220	159	283
11	266	299	359
12	242	257	304
13	102	174	136
14	135	315	211
15	116	223	214
16	117	120	127

Tabla XVIII. FH acumulado del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 500 ml.

ANÁLISIS DE VARIANZA. FRASCO DE 500 ml.

Ho1: Los efectos de los tiempos son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable tiempo.

Ha1: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable tiempo. Hay efecto del tiempo sobre la temperatura.

Ho2: Los efectos de los termopares son cero. No hay diferencia entre las medias de los distintos niveles de la variable termopar.

Ha2: Hay diferencia significativa entre los distintos niveles de la variable termopar. Hay efecto del termopar sobre la temperatura.

Ho3: No hay diferencia entre las distintas interacciones tiempo-termopar, ni efecto de las mismas sobre la temperatura.

Ha3: Hay diferencia significativa entre las interacciones tiempo-termopar y efecto de las mismas sobre la temperatura.

Tiempo	59	157699	2672.71	56.66	1.64
Termopar	15	724413	4829.56	102.39	1.92
Interacción	885	28313	31.99	0.67	1.51
Subtotal	959	258446			
Error residual	1920	90561	47.16		
Total	2879	349007			

Tabla XIX. Análisis de varianza de 2 factores del estudio de distribución de calor en cámara con carga frasco de 500 ml.

Si $F_{cal.} < F_{tab.}$ Ho se acepta

$F_{tab.}$ con $\alpha = 0.05$

CONCLUSION

Ho1: Se rechaza

Ho2: Se rechaza

Ho3: Se acepta

ESTUDIO							
CÁMERA	TIEMPO (minutos)	DISTRIBUCIÓN DE CALOR				RETO BIOLÓGICO	
		CÁMERA VACÍA		CÁMERA CON CARGA		ENDOTOXINA	FH
		HOMOGENEA/ HETEROGENEA	PUNTO FRÍO (Temp / Tiempo)	HOMOGENEA/ HETEROGENEA	PUNTO FRÍO (Temp / Tiempo)		
CÁMERA VACÍA (primera repetición)	0						
	30	AT = 20.8°C	231.8°C / 18				Corresponde
	60	AT = 11.3°C AT = 6.9°C	233.9°C / 2 228.9°C / 2				Corresponde Corresponde
CÁMERA VACÍA (segunda repetición)	0						
	30	HOMOGENEA AT = 22.7°C	228.8°C / 16				Corresponde
	60	AT = 11.3°C AT = 10.2°C	233.3°C / 2 228.6°C / 2				Corresponde Corresponde
CÁMERA VACÍA (tercera repetición)	0						
	30	HOMOGENEA AT = 30.8°C	222.4°C / 16				Corresponde
	60	AT = 13.9°C AT = 11.9°C	228.2°C / 16 231.8°C / 8				Corresponde Corresponde
FRASCO DE 26 ml (primera repetición)	0						
	30			AT = 71.1°C	186.4°C / 8	Negativo	Corresponde
	60			AT = 47.2°C AT = 14.1°C	221.6°C / 8 240.8°C / 8	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 26 ml (segunda repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 85.4°C	187.2°C / 1	Negativo	Corresponde
	60			AT = 16.7°C AT = 16.7°C	238.0°C / 8 230.4°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 26 ml (tercera repetición)	0						
	30			HOMOGENEA AT = 42.9°C	192.8°C / 1	Negativo	Corresponde
	60			AT = 34.3°C AT = 14.0°C	237.1°C / 1 231.8°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 50 ml (primera repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 49.5°C	200.3°C / 1	Negativo	Corresponde
	60			AT = 32.2°C AT = 18.8°C	233.4°C / 3 231.8°C / 3	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 80 ml (segunda repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 46.7°C	188.1°C / 1	Negativo	Corresponde
	60			AT = 30.3°C AT = 11.8°C	238.8°C / 1 236.3°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 80 ml (tercera repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 41.9°C	208.8°C / 13	Negativo	Corresponde
	60			AT = 16.4°C AT = 12.0°C	238.8°C / 13 228.8°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 100 ml (primera repetición)	0						
	30			HOMOGENEA AT = 43.1°C	205.9°C / 13	Negativo	Corresponde
	60			AT = 20.8°C AT = 11.8°C	236.1°C / 13 228.8°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 100 ml (segunda repetición)	0						
	30			HOMOGENEA AT = 34.4°C	206.4°C / 1	Negativo	Corresponde
	60			AT = 23.0°C AT = 15.2°C	243.4°C / 1 237.4°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 100 ml (tercera repetición)	0						
	30			HOMOGENEA AT = 30.8°C	218.5°C / 8	Negativo	Corresponde
	60			AT = 14.3°C AT = 14.2°C	240.8°C / 16 227.0°C / 8	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 250 ml (primera repetición)	0						
	30			HOMOGENEA AT = 54.2°C	182.6°C / 13	Negativo	Corresponde
	60			AT = 22.1°C AT = 10.3°C	237.1°C / 13 240.4°C / 17	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 250 ml (segunda repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 49.4°C	188.8°C / 16	Negativo	Corresponde
	60			AT = 37.2°C AT = 18.8°C	233.1°C / 16 227.8°C / 17	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 250 ml (tercera repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 43.0°C	181.6°C / 2	Negativo	Corresponde
	60			AT = 41.8°C AT = 20.3°C	248.4°C / 16 250.1°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 500 ml (primera repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 64.8°C	203.8°C / 6	Negativo	Corresponde
	60			AT = 32.2°C AT = 12.0°C	233.4°C / 6 228.7°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 500 ml (segunda repetición)	0						
	30			HETEROGENEA AT = 41.8°C	186.0°C / 1	Negativo	Corresponde
	60			AT = 23.1°C AT = 13.2°C	243.8°C / 1 238.8°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde
FRASCO DE 500 ml (tercera repetición)	0						
	30			HOMOGENEA AT = 14.0°C	243.4°C / 13	Negativo	Corresponde
	60			AT = 10.6°C AT = 14.0°C	243.8°C / 16 231.8°C / 16	Negativo Negativo	Corresponde Corresponde

Tabla XX. Resultados distribución de calor cámara vacía, distribución de calor cámara con carga y reto biológico.

8. CONCLUSIONES

8.1

Previa a la validación se realizó la calificación del equipo por los departamentos de Mantenimiento y Metrología. Dicha calificación demuestra que el equipo funciona y está instalado de acuerdo a sus especificaciones.

8.2

La distribución de calor es homogénea en la cámara vacía alcanzando la temperatura de despirogenización en todos los puntos muestreados en la cámara.

8.3

La distribución de calor en cámara con carga no es homogénea para todos los patrones, sin embargo sí se alcanza una diferencia de temperatura de 25°C en todos los ciclos, y la temperatura de despirogenización en todos los puntos muestreados.

8.4

Ningún indicador biológico (endotoxina) dió positivo mediante la prueba de LAL.

8.5

Todos los valores de FH son superiores al establecido en tablas.

8.6

En las pruebas de esterilidad y pirógenos realizadas a producto terminado los resultados fueron negativos.

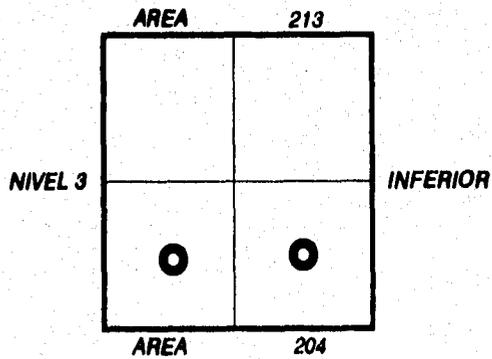
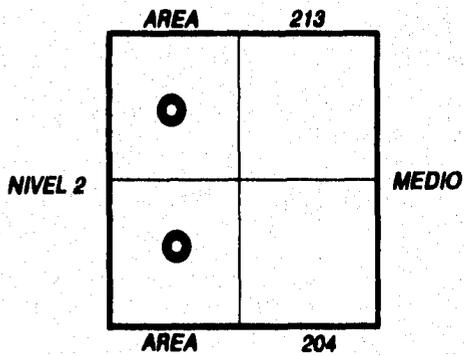
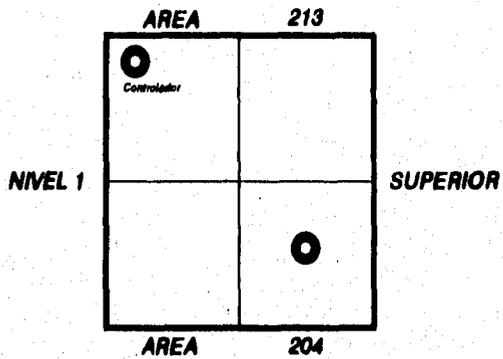
8.7

El ciclo de esterilización/despirogenización utilizando calor seco en el Horno Reinhardt es efectivo, confiable y reproducible bajo las condiciones de uso del equipo (235°C, 60 minutos).

El Plan de Validación realizado certifica que el procedimiento de esterilización/despirogenización efectuado en el Horno Reinhardt, cumple con las especificaciones recomendadas por FDA, para su empleo rutinario en la manufactura de productos inyectables.

8.1 SUGERENCIAS

ACOMODO DE TERMOPARES



9. ANEXOS

ANEXO I

TABLA ANALISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES

Factor	d.f.	S.C.	VARIANZA	F _{calculada}
Files (A)	I-1	$SC_A = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I \frac{x_i^2}{n_i} - \frac{x^2}{N}$	$s^2 = \frac{SC_A}{I-1}$	$F_A = \frac{s^2}{s_e^2}$
Columnas (B)	J-1	$SC_B = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x^2}{N}$	$s^2 = \frac{SC_B}{J-1}$	$F_B = \frac{s^2}{s_e^2}$
Interacción (AB)	(I-1)(J-1)	$SC_{AB} = SC_{total} - SC_A - SC_B$	$s^2 = \frac{SC_{AB}}{(I-1)(J-1)}$	$F_{AB} = \frac{s^2}{s_e^2}$
Subtotal	IJ-1	$SC_{total} = \frac{1}{IJ} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{x_{ij}^2}{n_{ij}} - \frac{x^2}{N}$		
Error residual	N-IJ	$SC_{error} = SC_{total} - SC_{AB}$	$s_e^2 = \frac{SC_{error}}{N-IJ}$	
Total	N-1	$SC_{total} = \frac{1}{IJ} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{x_{ij}^2}{n_{ij}} - \frac{x^2}{N}$		

Donde:

$$n_i = \sum_{j=1}^J n_{ij} = \text{número de observaciones por fila}$$

$$n_j = \sum_{i=1}^I n_{ij} = \text{número de observaciones por columna}$$

$$N = \sum_{i=1}^I n_i = \sum_{j=1}^J n_j = \text{número total de observaciones}$$

$$X_{ij} = \sum_{k=1}^{n_{ij}} X_{ijk} = \text{sumas de las observaciones de la casilla } ij$$

$$X_{i..} = \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^{n_{ij}} X_{ijk} = \text{suma de las observaciones de la fila } i.$$

$$X_{.j} = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{n_j} X_{ijk} = \text{suma de las observaciones de la columna } j.$$

$$X_{\dots} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^{n_j} X_{ijk} = \text{suma de todas las observaciones}$$

i = índice de fila

j = índice de columna

k = índice de la observación individual de una casilla

J = número de columnas

I = número de filas

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO II

CARGAS MAXIMAS DEL HORNO

Frasco de 25 ml	3	12 600
Frasco de 50 ml	4	9 000
Frasco de 100 ml	4	5 800
Frasco de 250 ml	4	2 400
Frasco de 500 ml	4	1 350
Casquillo		

ANEXO III

ABREVIACIONES

DNA: Acido desoxirribonucleico

FDA: Food and Drug Administration

F: Tiempo de exposición efectivo a la temperatura deseada para la esterilización

F₀: Es el tiempo requerido a cualquier temperatura que es equivalente a un efecto de esterilización a 121°C

FH: Es la integración de la letalidad a una temperatura de referencia de 170°C

g.l: Grados de libertad

HEPA: Filtros de alta eficiencia

m.o.: Microorganismos

LAL: Lisado de Amebocitos de Limulus

PDA: Parenteral Drug Administration

RNA: Acido ribonucleico

S.C: Suma de cuadrados

UE: Unidades de endotoxina

USP: United States Pharmacopeia

10. BIBLIOGRAFIA

1. Loftus, B.T., et al, "Pharmaceutical Process Validation", Ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1984, 1-26, 267-277.
2. Alperin, G., "Validation Considerations in Pharmaceutical Processes and Plant Design", Pharmaceutical Engineering, 15-19, Mayo-Junio, 1984.
3. Chapman, K.G., "The PAR Approach to Process Validation", Pharmaceutical Technology, Diciembre 1984.
4. FIP, "Validation and Control of Non-Standard Sterilization Processes", Journal of Parenteral Science and Technology, 47 (1) 9-15, 1993.
5. Lachman, L., et al, "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", 3a.ed., Ed. Lea and Febiger, USA, 1986, 619-628, 636-640, 644-651.
6. United States Pharmacopeia XXIII-National Forum XVI, 1995, 173-175, 1705-1707, 170-171.
7. Cooper, M.S., et al, "Quality Control in the Pharmaceutical Industry", Vol.2, Ed. Academic Press Inc., USA, 1973, 78-94.
8. Carleton, F.J., et al, "Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes", Ed. Marcel Dekker Inc., USA, 1986.
9. PDA, "Technical Report #7. Depyrogenation", USA, 1985, 101-112.
10. Zhang, H., et al, "The Impact of an Autoclave Cycle on the Chemical Stability of Parenteral Products", Journal of Parenteral Science and Technology, 47 (4) 177-179, 1993.
11. PDA, "Technical Report #3. Validation of Dry Heat Processes Used for Sterilization and Depyrogenation", USA, 1981.
12. Ludwig, J.D., et al, "Dry Heat Inactivation of Rough Strain Lipopolysaccharide and Diphosphoryl Lipid A on the Surface of Glass", Journal of Parenteral Science and Technology, 45 (1) 35-40, 1991.
13. Hecker, W., et al, "Validation of Dry Heat Inactivation of Bacterial Endotoxins", Journal of Parenteral Science and Technology, 48 (4) 197-204, 1994.
14. Ludwig, J.D., "Validation of a Heating Cell for Precisely Controlled Studies on the Thermal Destruction of Endotoxin in Glass", Journal of Parenteral Science and Technology, 42 (1) 9-14, 1988.
15. Nakata, T., "Destruction of Challenged Endotoxin in a Dry Heat Oven", Journal of Parenteral Science and Technology, 48 (2) 59-63, 1994.
16. Couriel, Benito D., "Validación de Procesos Farmacéuticos", Asociación Farmacéutica Mexicana, México, 40-49, 1982.
17. LAL Users Group, "Preparation and Use of Endotoxin Indicators for Depyrogenation Process Studies", Journal of Parenteral Science and Technology, 43 (5), 226-230, 1989.
18. Dony, J., et al, "Sterility Assurance Based on Validation of the Sterilization Process Using Steam Under Pressure", Journal of Parenteral Science and Technology, 43 (5), 226-230, 1989.
19. Secretaría de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. ed., 175-182, 1995.

20. PDA, "Technical Monograph #1. Validation of Steam Sterilization Cycles", USA, 1978.
21. Criado, J.A., et al, "Criterios para la Selección de Termopares", *Ingeniería Química*, (194), 39-43, 1985.
22. Marquis de Cantu, M.J., "Probabilidad y Estadística", Edit. Mc Graw Hill, México, 1990, pp 361-362, 394-401.
23. Secretaría de Salud. Comité Nacional de Validación, "Áreas Asépticas. Hornos y Autoclaves", México, 1990.