



29  
201

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
" Z A R A G O Z A "

VALIDACION DE UN PROCESO DE ESTERILIZACION  
CON VAPOR PARA MEDIOS DE CULTIVO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
MARGARITO A. MORALES BORBOA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **I N D I C E**

I. INTRODUCCION.	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	17
IV. OBJETIVOS.	19
V. HIPOTESIS.	19
VI. EQUIPO Y MATERIAL.	20
VII. METODOS.	23
VIII. RESULTADOS Y DISCUSION.	37
IX. CONCLUSIONES.	84
X. APENDICE.	86
XI. RECOMENDACIONES.	90
XII. BIBLIOGRAFIA.	91

## I. INTRODUCCION.

La finalidad de obtener medicamentos cada vez mejores ha sido reforzada por la adopción y práctica de métodos de manufactura reconocidos como correctos y efectivos.

Un aspecto de importancia central en el empleo de técnicas y procedimientos de fabricación es la utilización de procesos y sistemas que han demostrado ser confiables mediante el procedimiento de validación.

El término "validación" ha sido empleado para describir al conjunto de pruebas que constituyen la evaluación crítica de la confiabilidad y reproducibilidad de toda operación o proceso relacionado con la fabricación de medicamentos. Los métodos empleados en la validación farmacéutica, conjuntamente con las técnicas de análisis estadístico tienen una importancia primordial en la obtención de procesos productivos que den los resultados deseados, ajustándose a los lineamientos de las prácticas correctas de fabricación. Ya que validar implica entre otros atributos "reproducir", de ahí que antes de validar un método, técnica o proceso, éstos deben estar optimizados y el parámetro base, es la calidad y por ello en toda la validación se mencionan las Prácticas Adecuadas de Manufactura (PAM), como puntos a seguirse para lograr la calidad deseada, con ella la optimización y posteriormente realizar la validación.

Actualmente lo que está involucrado en la validación de procesos y las PAM según la FDA (Food and Drug Administration) son los siguientes aspectos:

- Requerimientos relacionados con el equipo (Parte 211, subparte D) : Prácticas Adecuadas de Manufactura en el proceso, acondicionado y manejo de Fármacos(16).
- Diseño de equipo y localización (Sección 211.63).
- Construcción del equipo (Sección 211.65).
- Limpieza, y mantenimiento del equipo (Sección 211.67).
- Equipo mecánico automático , electrónico y calibración del mismo (Sección 211.68).
- Filtros para los sistemas de filtración (Sección 211.72).
- Requerimientos relacionados con la producción y los controles del proceso, en la Parte 211, subparte F):
- Control de la contaminación microbiológica (Sección 211.113).

Un programa de certificación debe emplearse con métodos estándares que confirmen que los requerimientos de las PAM han sido verificados en cada componente del equipo.

Los orígenes de validar desde el punto de vista regulatorio, se localizan en los Estados Unidos, y se remonta a la década de los 70', en esos años se desea verificar en forma documentada, la confiabilidad de las técnicas analíticas.

En la revisión de las normas para las Prácticas Adecuadas de Manufactura de 1976, la FDA menciona por primera vez el concepto de validación de procesos aplicado específicamente a la

esterilización. Dado el interés despertado por el tema, la FDA decide establecer directrices de tipo informativo para orientar acerca de la validación de procesos Farmacéuticos en un sentido general.

A partir de 1985, dicha administración considera que todo proceso que no este validado esta fuera de control. Circunstancias similares se han venido presentando en países de la Comunidad Europea, aunque basados principalmente en los antecedentes establecidos por los Estados Unidos(6).

Es importante hacer notar que las pruebas farmacopeicas rutinarias no constituyen un proceso de validación, pues no es suficiente con decir que todos los lotes de cientos de productos han reunido las especificaciones ya sean de farmacopea o internas de la compañía.

Cada producto tiene su propias características por lo tanto, requiere de pruebas específicas o especiales.

## II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

Debido al gran uso que hace la Industria Farmacéutica de los procesos de Esterilización en las diferentes etapas de la manufactura de un medicamento, es necesario determinar la confiabilidad de los mismos.

Así mismo se necesita conocer qué grado de seguridad de esterilidad proporcionará a los productos sometidos al proceso.

Sabemos que hay varios procesos de esterilización entre los cuales se encuentran los procesos con calor (húmedo y seco), los procesos de filtración, los de radiación y los procesos con gas, entre otros.

Estos procesos, no son aplicables a un sólo producto, para poder elegir el apropiado, se necesita conocer la naturaleza del producto a tratar, así por ejemplo, no es adecuado esterilizar por calor, un producto que sea lábil al mismo.

Después de la elección del proceso a utilizar, es importante plantear la siguiente pregunta ¿Cómo determinamos si este proporciona el nivel de esterilidad necesario? La respuesta está en el estudio de validación del proceso, cuyo desarrollo mediante experimentos documentados permite determinar si el proceso da lugar a un producto con los atributos de calidad deseados.

Proceso de destrucción microbiana por calor.  
Independientemente del tipo de letalidad inducida por un proceso

de esterilización hacia los microorganismos y sobre la exposición de niveles adecuados de tales tratamientos, estos mueren acorde a una relación logarítmica entre la concentración o población de las células vivas y el tiempo de exposición a que es sometido por el proceso(3).

Esta relación entre la población microbiana y el tiempo puede ser lineal o no lineal. El término que define esta relación se llama D y es definido como el "tiempo requerido para una reducción de un logaritmo en la población microbiana"(12). El valor D es una expresión cuantitativa de la velocidad de muerte de los microorganismos, también es el tiempo requerido para reducir en un 90% la población microbiana(3).

#### Valores Z y F.

Estos términos son aplicados exclusivamente en la validación de procesos de esterilización por calor, ya sea húmedo o seco(3). El valor Z es un factor dependiente de la temperatura medido en grados, también es un coeficiente de temperatura de destrucción microbiana(12). El valor Z puede ser simplificado como la temperatura requerida para reducir en un logaritmo el valor D(3).

El valor F es definido como el tiempo en minutos para producir un efecto equivalente de esterilización(1)(12).

Quando se asume un valor de Z igual a 10 C y una temperatura de 121 C el valor F es escrito como  $F_0$ (3)(12).



El valor de  $Z$  igual a  $10^{\circ}\text{C}$  es el más utilizado para la destrucción de esporas microbianas con vapor, basado en observaciones experimentales para Bacillus stearothermophilus, que es un organismo altamente resistente al calor húmedo.

El valor  $D$  es importante en la validación de los procesos de esterilización por varias razones(3):

1.- Es una expresión cinética específica para cada microorganismo, sujeto a un medio ambiente específico y a un agente esterilizante o condiciones específicas. En otras palabras, el valor  $D$  puede ser afectado por :

- a. El tipo de microorganismo .
- b. Las características y componentes del material a esterilizar.
- c. La superficie en la cual los microorganismos son expuestos.
- d. Las condiciones del proceso.

2.- El conocimiento del valor  $D$  a diferentes temperaturas en el proceso de esterilización es necesario para el cálculo del valor de  $Z$ .

3.- El valor  $D$  es usado en el cálculo del valor  $F$ .

4.- Extrapolando el valor  $D$  de un microorganismo específico se puede predecir el número de reducciones logarítmicas para un determinado proceso.

El valor  $D$  es determinado experimentalmente por 2 métodos, el de la curva de sobrevivencia y el de la fracción negativa(1)(3).

Cuando se esterilizan materiales estables al calor, puede emplearse el enfoque de sobrematanza, en donde la preocupación principal es tener la esterilización asegurada(1)(5).

Desde este punto de vista se entiende que la letalidad es suficiente en un ciclo de esterilización para proveer cuando menos un  $10^{-6}$  de probabilidad de sobrevivencia microbiana, independientemente del número de resistencia al calor, de los microorganismos que existen en forma natural. Cuando esto sucede por lo general se obtienen valores altos de  $F_0$ (1)(5).

También es conveniente que el ciclo proporcione un  $F_0$  que da por resultado cuando menos una reducción de microorganismo de 12 logaritmos, teniendo un valor D de 1 minuto(1)(5).

Un ciclo de esterilización nos dará por resultado una reducción de  $10^{12}$  cuando  $D = 1$  minuto. Una reducción de  $10^{24}$  si la  $D = 0.5$  y una reducción de  $10^{121}$  si la  $D = 0.1$  minuto(5).

Cuando se emplea el método de sobrematanza es mínima la necesidad de llevar a cabo estudios de resistencia al calor húmedo o cálculos de probabilidad de sobrevivencia relativos a los microorganismos de la biocarga del producto, ya que las condiciones de la esterilización aseguran una probabilidad de sobrevivencia de al menos  $1 \times 10^{-6}$  (1)(5).

La diferencia primordial en la validación entre los enfoques de Probabilidad de Supervivencia y de Sobrematanza es la manera como se obtiene el proceso requerido de mínima letalidad. Cuando se emplea el enfoque de Probabilidad de Supervivencia, el valor

mínimo de  $F_0$  requerido se determina con base al número y resistencia de los microorganismos en el producto.

Una vez hecha esta determinación, los estudios de validación se llevan a cabo para asegurarse que el punto más frío dentro de la carga recibe el valor de  $F_0$  determinado.

Para determinar los valores de  $F_0$  cuando se emplea el enfoque de capacidad de sobremuerte no se requieren datos de biocarga ni de resistencia al calor. En su lugar, se ajustan parámetros del ciclo para asegurarse que el punto más frío en el patrón de carga recibe un  $F_0$  que asegure cuando menos una reducción de 12 logaritmos de microorganismos que tengan un valor  $D$  de un minuto.

Debe tenerse en cuenta que el enfoque de capacidad de sobremuerte no implica que se requiera menor precaución en la prevención de la contaminación microbiana. Siguen siendo de primordial importancia, el control del medio ambiente durante la manufactura y el seguimiento de las PAM (que asegure barreras a la contaminación microbiana).

Hay varias definiciones del término Validación de Procesos, a continuación mencionamos algunas:

a) Programa destinado a establecer evidencia documentada, que permita asegurar con alto grado de confianza y teniendo en cuenta el estado del conocimiento y el arte farmacéutico, que a través de un proceso específico se obtiene o se obtendrá un producto que reúne todas las especificaciones y atributos de calidad preestablecidos(7).

b) Comprobación de que un proceso se desarrolla tal y como se ha previsto para cada producto y de manera reproducible a través de un plan experimental denominado protocolo de validación.

c) Comprobación y certificación formal y sistemática de que un proceso se realiza de tal manera que permite que cada producto tenga la calidad diseñada.

d) Evidencia documentada, que establece que un proceso realiza su propósito, para lo cual fue creado(14).

Estas son algunas de las muchas definiciones que se manejan para el término de validación de procesos; también a continuación definiremos algunos términos relacionados con la validación en general.

**Validación Concurrente:** Evidencia documentada que establece que un sistema o proceso realiza su propósito, basado en información generada durante la implementación del sistema o proceso(14).

**Validación Prospectiva:** Es la evidencia documentada realizada antes de que el producto salga al mercado que demuestre que las operaciones se encuentran bajo control(aplicable a nuevos productos, reformulaciones o cambios de equipo de proceso)(15).

**Validación retrospectiva:** Es la evidencia documentada basada en los datos acumulados de producción, análisis y control de que un producto ya en distribución está siendo fabricado con efectividad (La validación retrospectiva no se puede aplicar a equipos de proceso)(15).

Protocolo de Validación: Documento de un plan prospectivo experimental, que cuando es llevado a cabo, es encaminado a producir evidencia documentada de que un proceso o sistema ha sido validado(14).

El proceso de esterilización consiste en librar a cualquier objeto, superficie o medio de todos los microorganismos que los contaminen ya sea en estado vegetativo o esporulado mediante la remoción o muerte(10).

En el laboratorio de microbiología se recurre a una variedad de métodos para lograr este fin. Como por ejemplo, la utilización de calor, ya sea seco o húmedo. Al preparar medios de cultivo se debe tomar en cuenta a los microorganismos que se hallan presentes en las sustancias y en la vidriería empleadas para este propósito. El medio preparado, por lo tanto debe finalmente sujetarse a un proceso de esterilización por medio de calor húmedo.

El programa de Validación comprende las siguientes fases:

- 1.- Calificación de documentación.
- 2.- Calificación del equipo.
- 3.- Calificación operacional.

#### 1.0 Calificación de Documentación.

La documentación requerida durante la organización de la validación es una parte esencial del trabajo.

Los principales documentos a calificar son los procedimientos de operación, limpieza y mantenimiento, estos son sometidos a

conocimiento de los operadores y del personal involucrado en el desarrollo de los mismos, y se evalúa el contenido para determinar que este redactado correctamente y contenga toda la información necesaria.

## 2.- Calificación del equipo.

2.1 Calificación de Instalaciones.- Es la verificación documentada de que todos los aspectos principales de la instalación, se apegan a los códigos apropiados, diseño autorizado y recomendaciones del fabricante(14).

En esta parte de la validación se debe verificar que las instalaciones sean las adecuadas y cumplan con las especificaciones del diseño original(9).

## 2.2 Calibración de Instrumentos.

Conjunto de operaciones que tiene por finalidad determinar los errores del instrumento para medir y de ser necesario, otras características metrologicas, así como en su caso ajuste correspondiente.

Entre los instrumentos que se deben calibrar se puede tener: el graficador, el registrador, la valvula de seguridad, los termopares y el registrador multipuntual, entre otros(9)(12).

La calibración se debe efectuar con estándares certificados por la Subdirección de Metrología dependiente de la D.G.N. La calibración debe reflejar la precisión y exactitud del instrumento en cuestión.

### 3.0 Calificación Operacional.

Verificación documentada de que un sistema o subsistema realiza su propósito como se desea, en un intervalo de operación aprobado(14).

Las pruebas a desarrollar para verificar la calificación operacional son las siguientes: Distribución de Calor, Penetración de Calor y el Bioriesgo.

#### 3.1 Distribución de Calor.

Son estudios para verificar la aceptabilidad de un recipiente que provee un medio de calentamiento uniforme(1).

Los estudios de distribución de calor incluyen 2 fases. La primera es la distribución de calor en cámara vacía y la segunda es la distribución de calor en cámara con carga(3).

##### 3.1.1 Distribución de Calor en cámara vacía.

Como se mencionó anteriormente, estos estudios sirven para verificar la capacidad del autoclave para distribuir de manera uniforme el calor y por lo tanto la detección de un punto frío o zona fría dentro de la cámara del autoclave. El punto frío es el sitio, el cual recibe menos calor respecto a los otros sitios evaluados en un intervalo definido de tiempo.

La uniformidad aceptable de temperatura deberá ser determinada por el fabricante. Aunque por regla general la uniformidad en la temperatura puede considerarse aceptable si la variación es menor de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  de la temperatura media de la cámara (1)(3)(5).

Este estudio se debe llevar al menos por triplicado y para dar seguimiento a la temperatura de la cámara se utilizan termopares tipo "T" que son de cobre-constantano(5), estos a su vez están conectados a un registrador multipuntual que da la lectura digital en grados centígrados de cada uno de los termopares.

Para el estudio se deben utilizar de 10 a 20 termopares, dependiendo del tamaño del autoclave(1)(3). La colocación de los mismos responde a un arreglo previamente definido en donde se tratará de dar seguimiento a zonas predeterminadas del autoclave, en la parte superior, inferior, anterior y posterior(1)(3).

Este estudio es aceptable si tres series o ciclos consecutivos son reproducibles.

### 3.1.2 Distribución de Calor en cámara con carga.

Se debe respetar en este estudio el número de termopares y la posición de los mismos(1). Así mismo un patrón de carga debe ser definido, esto quiere decir que siempre se tratará de los mismos materiales en la misma posición y en la misma cantidad.

Este estudio se hace con la finalidad de ver el efecto de la carga en el punto frío y esto es muy importante, ya que en los estudios de penetración de calor se da seguimiento al material que se localiza en el punto frío obtenido(1)(3).

En estos estudios de distribución de calor los termopares no deben estar en contacto con superficies selladas (ni del autoclave ni del material de la carga)(1)(5).



### 3.2 Penetración de Calor.

Esta es la parte más crítica de la validación, ya que los estudios de penetración de calor se llevan a cabo para asegurarse que el sitio más frío dentro del patrón de carga estará expuesto consistentemente a la suficiente letalidad por calor, el punto más frío es el que previamente se determina de los estudios de distribución de calor(3).

En este estudio los termopares son colocados en el interior del recipiente localizado en la zona fría(1)(3). Los datos de temperatura obtenidos de los termopares permiten calcular la letalidad y el valor de  $F_0$ , donde  $F_0$  es definido como el tiempo equivalente a 121 C para proporcionar la letalidad adecuada con fines de esterilización, utilizando un valor de  $Z$  de 10 C.

La Letalidad (L) puede ser determinada de los datos de temperatura obtenidos de los estudios de penetración de calor(1).

Los datos de temperatura son convertidos por la siguiente fórmula(1):

$$L = \log_{-1} \frac{T_0 - T_b}{Z} = 10 \frac{(T_0 - T_b)}{Z}$$

Donde:

$T_0$  = Temperatura dentro del recipiente o contenedor de prueba.

$T_b$  = Temperatura del proceso (121.1 C)

Z = Temperatura requerida para cambiar el valor de D por un factor de 10.

L = Letalidad.

Se determina posteriormente el Fo integrando las proporciones de letalidad a través del proceso de calentamiento.

$$F_0 = \int_{10} \frac{T - 121}{10} dt$$

Y en la práctica se calcula como:

$$F_0 = \sum_{10} \frac{T - 121}{10} \Delta t$$

Donde :

t = Intervalo de tiempo entre las mediciones de temperatura.

T = Temperatura registrada al tiempo t en grados centígrados.

Como se mencionó al principio, el enfoque con el cual se valida el proceso, es el de sobrecapacidad de muerte cuyo atributo es el de reducir en 12 logaritmos la población microbiana.

### 3.3 Biodesafío.

El desafío biológico es empleado para demostrar el grado de letalidad suministrado por el ciclo de esterilización(1). Para este propósito, se utilizan indicadores biológicos certificados que se adquieren en el mercado, a continuación mencionamos algunas marcas:

a) Dup-Spore (Indicator to determine efficiency steam sterilization):

Organismos: *Bacillus stearothermophilus*  $7.4 \times 10^4$   
*Bacillus subtilis*  $3.7 \times 10^5$

b) Sterikon : Organismos ;

*Bacillus stearothermophilus* Conc.  $2 \times 10^3$

c) Proof-plus : Organismos ;

*Bacillus stearothermophilus* Conc.  $1.6 \times 10^4$   
*Bacillus subtilis* Conc.  $2.1 \times 10^6$

El microorganismo utilizado más frecuentemente para desafiar el proceso de esterilización con vapor, es Bacillus stearothermophilus, por su alta resistencia a sobrevivir al calor húmedo.

En este trabajo se valida el proceso de esterilización con vapor para medios de cultivo utilizando el enfoque de capacidad de sobremuerte, el cual es empleado cuando el material puede soportar el tratamiento al calor sin sufrir efectos adversos. El empleo del enfoque de sobrematanza proporcionará la seguridad de un  $10^{-6}$  de probabilidad de sobrevivencia independientemente de la carga microbiana y de la resistencia al calor de la misma.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la Industria Farmacéutica hay problemas de calidad y entre las fuentes que los causan podemos citar a los procesos, al personal, a las materias primas, al material de empaque tanto primario como secundario.

Por lo tanto, es necesario que la Industria Farmacéutica controle sus procesos, al personal, las materias primas y defina las características de todos sus insumos para que se los haga saber a sus proveedores y estos suministren materiales con especificaciones preestablecidas que aseguren la elaboración de un producto con la calidad requerida.

Para controlar todos estos aspectos se hace necesario evaluar su confiabilidad mediante la validación.

Validar un proceso es tenerlo bajo control, y no solamente a este sino además evaluar la confiabilidad del personal, de los proveedores de insumos, de los servicios, de las instalaciones, de los métodos analíticos, entre otros.

Después de haber concluido su evaluación, se podrán detectar aquellas fuentes no confiables, para realizar las acciones correctivas necesarias y poder asegurar la calidad requerida del producto.

En un laboratorio de microbiología, un proceso que permite trabajar con materiales e insumos confiables en una gran variedad de pruebas microbiológicas (prueba de esterilidad, cuenta microbiológica, etc.) es la esterilización por calor húmedo ya que se requiere que los materiales, reactivos tengan el atributo de esterilidad, como en el caso de los medios de cultivo.

El presente trabajo se desarrolla para la validación de un proceso de esterilización con vapor para medios de cultivo.

#### IV. OBJETIVOS

Con el fin de establecer que el material a esterilizar está expuesto consistentemente a la suficiente letalidad por calor durante el proceso, se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar la aceptabilidad del autoclave para que provea una distribución del calor uniforme.
- Determinar el punto más frío del autoclave, para que en el mismo se provea la letalidad mínima para asegurar una reducción de cuando menos 12 logaritmos en la población microbiana.
- Determinar la reproducibilidad del ciclo de esterilización para asegurar que los materiales a tratar reciban consistentemente el tratamiento de calor especificado.

#### V. HIPOTESIS

Al validar el proceso de esterilización con vapor, se reunirá las condiciones necesarias de confiabilidad para asegurar un nivel de esterilidad de al menos  $1 \times 10^{-6}$  (al menos un microorganismo de un millón sobreviva).

## VI. EQUIPO Y MATERIAL

- Termopares tipo "T" de cobre-constantano con aislamiento Kepton-H para temperatura máxima de 300 ° C.
- Muestreador multiparámetro marca Azonix Mod. Scanner plus No. de serie S1223-B236 con 20 canales de entrada para temperatura.
- Impresora de cabeza térmica marca Azonix Mod. A7005 No. de serie 7/1337.
- Masking tape.
- Desarmador plano.
- Pinzas de punta.
- Autoclave de esterilización horizontal marca Tanques Garza S.A. modelo s/n, No. de serie s/n., clave 11-6546.
- Ampolleta de 2 ml. con esporas de Bacillus stearothermophilus marca Sterikon.
  - n = aprox. 1 000 esporas por ml
  - F = 14 a 15 minutos.
  - 121 ° C
  - Z = Aproximadamente de 4 ° C.
  - D = 3±1 minuto.
  - 121 ° C

- Tiras de esporas marca Duo-spore con las siguientes especificaciones:

$7.4 \times 10^5$  esporas de Bacillus stearothermophilus.

$3.7 \times 10^6$  esporas de Bacillus subtilis var. niger.

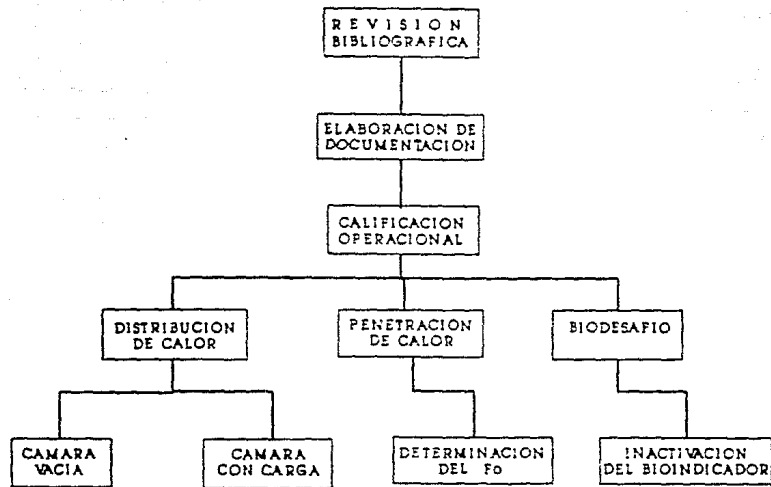
F = 15 minutos.  
121

- Medios de Cultivo:

- a) Agar No. 1 para antibioticos.
- b) Medio liquido de tioglicolato.
- c) Caldo lactosa.
- d) Caldo de soya tripticaseina.
- e) Peptona de caseina.



## DIAGRAMA DE FLUJO



## VII METODOS

### 1.- PROCEDIMIENTO DE OPERACION DEL AUTOCLAVE.

TITULO. PROCEDIMIENTO DE OPERACION DEL AUTOCLAVE DE CONTROL DE CALIDAD.

PROPOSITO. Llevar a cabo un proceso de esterilización adecuado para obtener un producto que cumpla con las especificaciones de Control de Calidad.

RESPONSABILIDAD. El Jefe del Departamento de Microbiología es responsable de que se cumpla el presente procedimiento.

PERIODICIDAD. El presente procedimiento se debiera llevar a cabo cuando se vaya a esterilizar algún producto, ya sea material de trabajo o medios de cultivo.

INSTRUCCIONES:

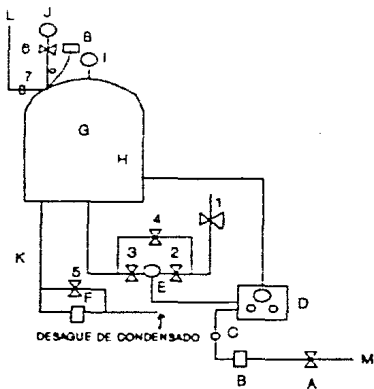
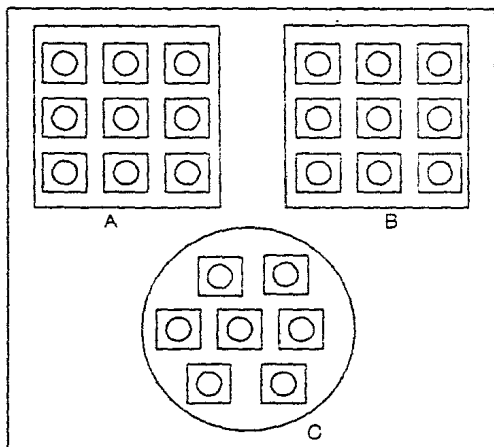


FIGURA No. 1  
ESQUEMA DE LOS COMPONENTES  
DEL AUTOCLAVE

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| A = Válvula de compuerta.       | 1. Válvula de llegada de vapor.              |
| B = Filtro de aire.             | 2. Válvula de globo de paso del vapor de 1". |
| C = Regulador de aire.          | 3. Válvula de globo paso 1".                 |
| D = Gráficoador y controlador.  | 4. Válvula de globo paso 1".                 |
| E = Válvula Hidroneumática.     | 5. Válvula de globo paso 1".                 |
| F = Trampa de condensados.      | 6. Válvula de globo.                         |
| G = Cámara de esterilización.   | 7. Válvula de mariposa.                      |
| H = Termómetro de mercurio.     | 8. Válvula de seguridad.                     |
| I = Termómetro bimetalico.      | 9. Filtro de Vapor.                          |
| J = Manómetro.                  |  |
| K = Tubería de condensados.     |  |
| L = Tubería de venteo.          |  |
| M = Tubería de aire comprimido. |  |

1. Antes de iniciar la operación asegurarse que este limpio el autoclave.
2. Verificar que la entrada de aire comprimido sea de 1.4 Kg/cm<sup>2</sup> o 20 libras/pulgada<sup>2</sup> indicada en el manómetro que se encuentra en el cartógrafo Taylor.
3. Colocar una gráfica No. OP 129 con graduación de 60 a 160 ° C y registrar en ella lo siguiente:
  - a) Número consecutivo de la carta y fecha de inicio.
  - b) Si se esteriliza medios de cultivo, clave de cada uno de ellos y número de lote de los mismos.

- c) Fecha de esterilización y número de carga.
- d) Si se esterilizan material limpio, indicar su uso.
- e) Indicar si es material sucio.
4. Fijar la temperatura deseada del proceso, moviendo la perilla roja que se encuentra en el cartógrafo Taylor para control de temperatura.
5. Cargar el autoclave con el material a esterilizar utilizando la siguiente distribución de carga, como lo indica la Fig. No. 2.



POSICIONES DE LA CARGA : A, B y C.

FIGURA No. 2  
DISTRIBUCION DE LA CARGA

6. Cerrar la puerta verificando que todos los opresores hagan buen cierre, haciéndolo siempre en cruz.
7. Abrir la llave No. 1 para alimentar de vapor al autoclave. Tener abiertas las llaves 2 y 3; la 4 siempre debe permanecer cerrada.
8. Abrir la válvula 5 y 7 para purgar el autoclave.
9. Cuando se llegue a los 100 °C cerrar la válvula No. 5.
10. Cuando se vea en la salida de la válvula No. 7 un flujo continuo de vapor, cerrarla.
11. Dejar correr el ciclo de esterilización el tiempo preestablecido de 15 minutos.
12. Una vez terminado el ciclo de esterilización, cerrar las válvulas 1, 2 y 3.
13. Abrir la válvula No. 7 para quitar la presión de vapor.
14. Una vez que el manómetro (j) marque 0.0 Kg/cm<sup>2</sup> de presión, abrir la válvula No. 5.
15. Abrir la puerta y sacar la carga que se esteriliza.

#### **PRECAUCIONES**

- Por ningún motivo abrir la puerta del autoclave cuando esta este funcionando, ya que hay un grave peligro de EXPLOSION.
- Cuando la válvula de seguridad se abra, inmediatamente cerrar las dos válvulas de paso del vapor 1 y 2 y abrir rápidamente las válvulas de purga del aire 7 y del condensador 5. Posteriormente notificar al responsable del área de lo sucedido.

## **2.- DISTRIBUCION DE CALOR EN AUTOCLAVE EN CAMARA VACIA.**

### **TITULO. DISTRIBUCION DE CALOR EN AUTOCLAVE EN CAMARA VACIA.**

**PROPOSITO.** Determinar la capacidad del autoclave para distribuir de manera homogénea el calor en cámara vacía. Localizar el punto frío del autoclave. Determinar si el proceso es reproducible.

#### **EQUIPO.**

- Monitor multiparámetros Marca Azonix Modelo Plus Clave CAL-030 termopares tipo "T", marca Kaye.
- Cinta adhesiva resistente al calor del proceso.

#### **PROCEDIMIENTO.**

- 1.- Colocar 10 termopares con ayuda de una cinta adhesiva, teniendo precaución de que las puntas de los termopares no hagan contacto con cualquier superficie, como se indica en la figura 3.
- 2.- Iniciar el ciclo de esterilización y registrar la temperatura cada minuto, de todos los termopares.

Realizar 2 ciclos más de manera independiente, bajo las mismas condiciones de operación.

CRITERIOS DE ACEPTACION.

1.- La amplitud entre la temperatura del punto frío y la temperatura promedio, no debe exceder en  $1.5^{\circ}\text{C}$ .

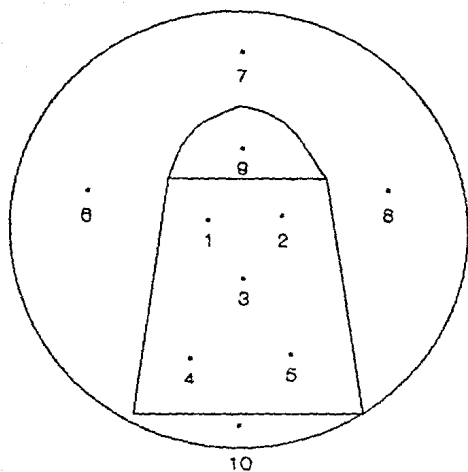


FIGURA No. 3

LOCALIZACION Y DISTRIBUCION  
DE LOS TERMOPARES  
EN CAMARA VACIA



### 3. DISTRIBUCION DE CALOR EN AUTOCLAVE CON CARGA.

#### TITULO. DISTRIBUCION DE CALOR EN AUTOCLAVE EN CAMARA CON CARGA.

PROPOSITO. Determinar la capacidad del equipo para distribuir el calor en cámara con carga y determinar su efecto en la localización del punto frío.

#### EQUIPO.

- Monitor multiparámetros Marca Azonix modelo Plus Clave CAL-030 termopares tipo "T", marca kaye.
- Cinta adhesiva resistente al calor del proceso.

#### PROCEDIMIENTO.

- 1.- Colocar 10 termopares con ayuda de una cinta adhesiva, teniendo precaución que la punta de los termopares no haga contacto con ninguna superficie; como se indica en la figura 4.
- 2.- Iniciar el ciclo de esterilización y registrar la temperatura cada minuto, de todos los termopares.

Realizar 2 ciclos más de manera independiente, bajo las mismas condiciones de operación.

CRITERIOS DE ACEPTACION.

1.- La amplitud entre la temperatura del punto frito y la temperatura promedio, no debe exceder en  $2^{\circ}$  C.

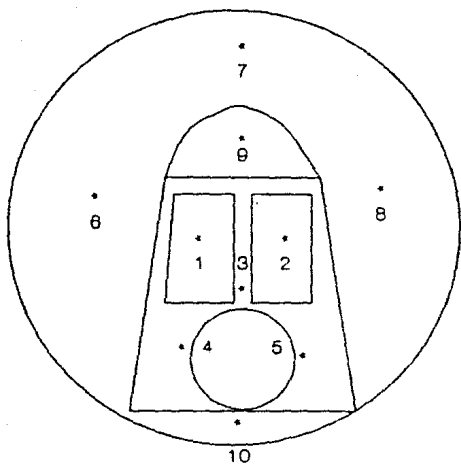


FIGURA No. 4

LOCALIZACION Y DISTRIBUCION  
DE LOS TERMOPARES  
EN CAMARA CON CARGA.

#### 4. PENETRACION DE CALOR.

##### TITULO. PENETRACION DE CALOR EN AUTOCLAVE.

PROPOSITO. Determinar el tiempo de muerte térmica en los lugares de menor temperatura, establecidos por los estudios de distribución de calor.

##### EQUIPO.

- Monitor multiparámetros marca Azonix, modelo Plus clave CAL-030.
- Termopares tipo "T", marca Kaye.
- Cinta adhesiva resistente al calor.
- Botellas con medio de cultivo para esterilizar.

##### PROCEDIMIENTO.

- 1.- Colocar 5 termopares en las posiciones que muestra la figura 5. La punta de los termopares debe hacer contacto con el material a esterilizar.
- 2.- Iniciar el ciclo de esterilización y registrar la temperatura cada minuto, de todos los termopares.

Realizar dos corridas más de manera independiente.

##### CRITERIOS DE ACEPTACION.

- Fo no menor a 12 minutos calculado en el punto frío.

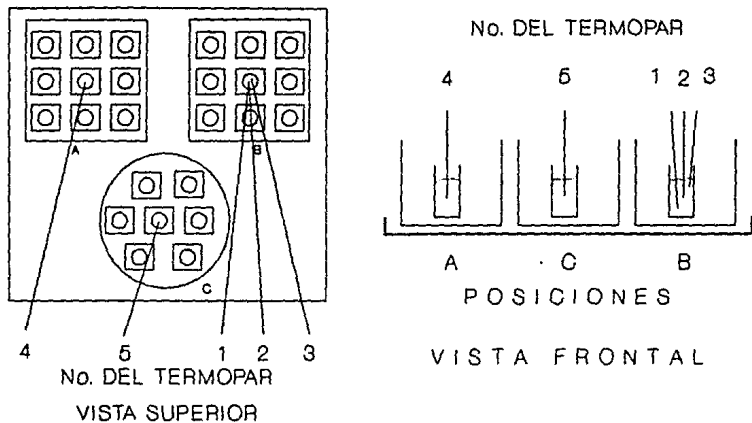


FIGURA No. 5  
 LOCALIZACION Y DISTRIBUCION DE LOS  
 TERMOPARES, EN PENETRACION DE CALOR.

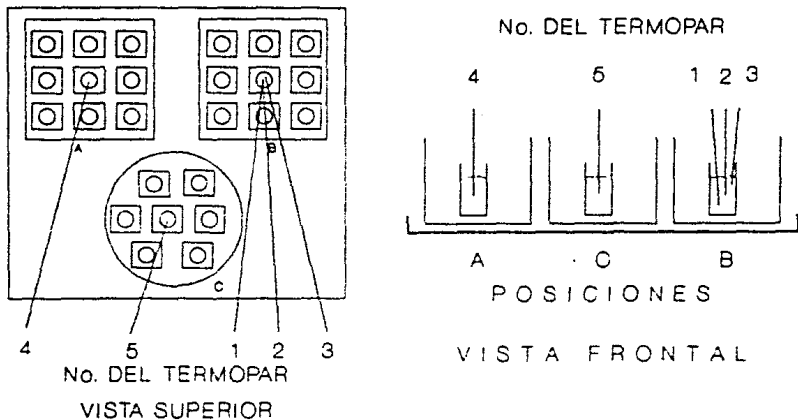


FIGURA No. 5  
 LOCALIZACION Y DISTRIBUCION DE LOS  
 TERMOPARES, EN PENETRACION DE CALOR.

### 5. BIODESAFIO

TITULO. BIODESAFIO EN AUTOCLAVE DE CONTROL DE CALIDAD.

PROPOSITO. Determinar la capacidad del proceso para la inactivación o muerte de las esporas de los bioindicadores.

EQUIPO Y MATERIAL.

- Sterikon.- Ampolleta de 2 ml conteniendo aproximadamente 1000 esporas por ml de Bacillus stearothermophilus, Fo de 14 a 15 min. <sup>o</sup> Z aproximado de 4 C.

- Duo-spore.- tira impregnada de esporas con :  
 $7.4 \times 10^5$  de esporas de Bacillus stearothermophilus y  
 $3.7 \times 10^6$  de esporas de Bacillus subtilis Var. niger,  
Fo de 15 minutos.

PROCEDIMIENTO.

1.- Colocar una ampolleta de sterikon y una tira de duo-spore en el punto frío, previamente determinado por los estudios de distribución de calor.

2.- Correr el ciclo de esterilización.

3.- Al terminar el ciclo incubar la ampolleta de sterikon a <sup>o</sup> 55 C durante dos días, y la tira de duo-spore incubaría en caldo de soya tripticasa por 7 días a <sup>o</sup> 55 C.

#### CRITERIOS DE ACEPTACION

- La ampollita de sterikon no debe sufrir ningun cambio en su aspecto fisico, despues del periodo de incubacion.
- La tira de duo-spore, no debe observarse crecimiento en el medio de cultivo despues del periodo de incubacion



## VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. CALIBRACION DE INSTRUMENTOS.

#### 1.1 Manometro:

Descripcion del Instrumento a calibrar:

Nombre: Manómetro                      Clave: MAR007                      Tipo: Bourdon

Marca: Metrón

Intervalo de: 0 a 7 en divisiones de 0.1

Unidades: Kg/cm<sup>2</sup>                                      Exactitud:  $\pm 0.1$

Patrón de referencia:

Nombre: Manómetro

Numero de certificado: M00789

Número de serie: 044582

Marca: USG

Límite de aceptación:  $\pm 0.15$  Kg/cm<sup>2</sup>.

#### Resultados

Referencia	Lectura			Diferencia	Error
	Ascenso	Descenso	Promedio		Absoluto
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0
2	1.96	1.97	1.96	+ 0.04	+ 0.04
3	2.99	2.98	2.98	+ 0.02	+ 0.02
4	3.93	3.93	3.93	+ 0.07	+ 0.07
5	4.93	4.93	4.93	- 0.07	+ 0.07
6	5.97	5.97	5.97	+ 0.03	+ 0.03
7	6.95	6.95	6.95	+ 0.05	- 0.05

Dictamen: Aprobado

1.2 Termómetro.

Descripción del Instrumento a calibrar:

Nombre: Termómetro bimetalico Clave: TER019 Tipo: Bimetalico

Marca: Tel-Tru

Intervalo de: 0 a 150 °C en divisiones de 1 °C

Unidades: °C Exactitud: ± 1 °C

Patrón de referencia:

Nombre: Marco de termómetros

Número de certificado: TE-130-89

Número de serie: M44121

Marca: Ertco ARTM66C

Límite de aceptación: ± 1 °C

Resultados

Lectura				
Referencia °C	T1 °C	T2 °C	Promedio °C	Diferencia °C
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
91.2	90.5	91.0	90.7	0.5
121.2	120.0	120.5	120.2	1.0
140.0	140.0	140.0	140.0	0.0

Dictamen: Aprobado

## 2. DISTRIBUCION DE CALOR EN CAMARA VACIA

### 2.1 Primera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de trabajo 124 C.
- Tiempo de esterilización 15 minutos.
- Presión de trabajo 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

En el Cuadro 1 se observan los resultados de la primera corrida donde se muestra la temperatura promedio, en cada tiempo de registro así como la temperatura mínima registrada y la amplitud entre estos datos; al final del cuadro se muestra la temperatura promedio de todo el proceso.

Cuadro 1

Tiempo	Temperatura (°C) x	Temperatura o mínima C	Amplitud o C
1	124.00	123.80	0.26
2	124.11	123.80	0.31
3	124.25	124.00	0.25
4	124.34	124.00	0.34
5	124.34	124.00	0.34
6	124.40	124.10	0.30
7	124.26	124.00	0.26
8	124.17	123.90	0.27
9	124.22	124.00	0.22
10	124.37	124.10	0.27
11	124.36	124.20	0.16
12	124.35	124.20	0.16
13	124.20	124.00	0.20
14	124.13	123.90	0.23
15	124.00	123.80	0.20

$$\bar{x} = 124.24$$

En el cuadro 2 se muestran las lecturas de las temperaturas mínima y máxima en cada tiempo de registro así como el termopar que la registra; también la amplitud de estos termopares en cada uno de los tiempos registrados del proceso.

-----  
Cuadro 2  
-----

----- Tiempo -----	Tempe- ratura o C	Termo- par	Tempe- ratura o C	Termo- par	Amplitud o C
-----	mínima	No	máxima	No	-----
1	123.8	1	124.4	10	0.60
2	123.8	1	124.5	10	0.70
3	124.0	1	124.5	9	0.50
4	124.0	1	124.7	10	0.70
5	124.0	1	124.5	7	0.60
6	124.1	1	124.7	10	0.60
7	124.0	1	124.6	10	0.60
8	123.9	1	124.5	7	0.60
9	124.0	1	124.5	10	0.50
10	124.1	2	124.7	10	0.60
11	124.2	1	124.6	7	0.40
12	124.2	2	124.7	7	0.50
13	124.0	1	124.5	7	0.50
14	123.9	2	124.5	7	0.60
15	123.6	1	124.6	10	0.80

-----

A continuación se informa de los resultados que nos permiten definir si la corrida fue satisfactoria:

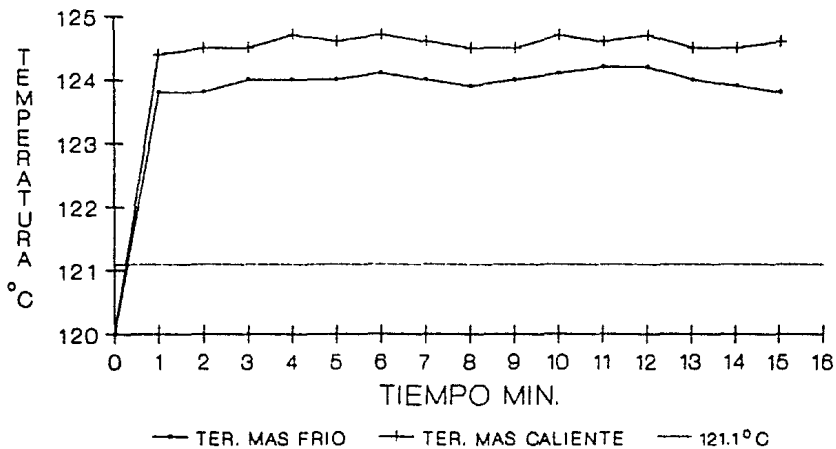
- Temperatura máxima durante el proceso    124.7 C.
- Temperatura mínima durante el proceso    123.8 C.
- Amplitud máxima entre los termopares    0.9 C.

- Amplitud máxima entre la temperatura promedio de todo el proceso y la temperatura mínima 0.44 C.

Todos los resultados obtenidos están dentro de los criterios de aceptación.

Con los datos del cuadro 2 se construyó la gráfica 1, para observar el perfil térmico máximo y mínimo del proceso.

# DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA VACIA



PRIMERA CORRIDA

GRAFICA No 1.

## 2.2 Segunda corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de trabajo 124 °C.
- Tiempo de esterilización 15 minutos.
- Presión de trabajo 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

En el Cuadro 3 se observan los resultados de la segunda corrida donde se muestra la temperatura promedio, en cada tiempo de registro así como la temperatura mínima registrada y la amplitud entre estos datos, al final del cuadro se muestra la temperatura promedio de todo el proceso.

Cuadro 3

Tiempo	Temperatura (°C) $\bar{x}$	Temperatura ° mínima C	Amplitud ° C
1	123.79	123.50	0.29
2	124.00	123.70	0.30
3	124.09	123.80	0.29
4	124.21	123.80	0.41
5	124.30	123.90	0.40
6	124.24	123.90	0.34
7	124.22	123.90	0.32
8	124.28	124.00	0.28
9	124.42	124.10	0.32
10	124.43	124.10	0.33
11	124.30	124.00	0.30
12	124.21	123.90	0.31
13	124.10	123.60	0.30
14	123.99	123.70	0.29
15	123.90	123.60	0.30

$$\bar{x} = 124.16$$

En el cuadro 4 se muestran las lecturas de las temperaturas mínima y máxima en cada tiempo de registro así como el termopar que la registra, también la amplitud de estos termopares en cada uno de los tiempos registrados durante todo el proceso.

Cuadro 4					
Tiempo	Temperatura C	Termopar	Temperatura C	Termopar	Amplitud C
	mínima	No	máxima	No	
1	123.5	1	124.1	10	0.60
2	123.7	1	124.3	10	0.60
3	123.8	1	124.4	10	0.60
4	123.8	1	124.5	10	0.70
5	123.9	1	124.6	10	0.70
6	123.9	1	124.5	8	0.60
7	123.9	1	124.5	8	0.60
8	124.0	4	124.5	8	0.50
9	124.1	1	124.7	9	0.60
10	124.1	1	124.7	9	0.60
11	124.0	1	124.6	9	0.60
12	123.9	4	124.5	8	0.60
13	123.8	4	124.3	8	0.50
14	123.7	4	124.2	8	0.50
15	123.6	4	124.1	8	0.50

A continuación se informa de los resultados que nos permiten definir si la corrida fue satisfactoria.

- Temperatura máxima durante el proceso 124.7 C
- Temperatura mínima durante el proceso 123.5 C
- Amplitud máxima entre los termopares 1.2 C

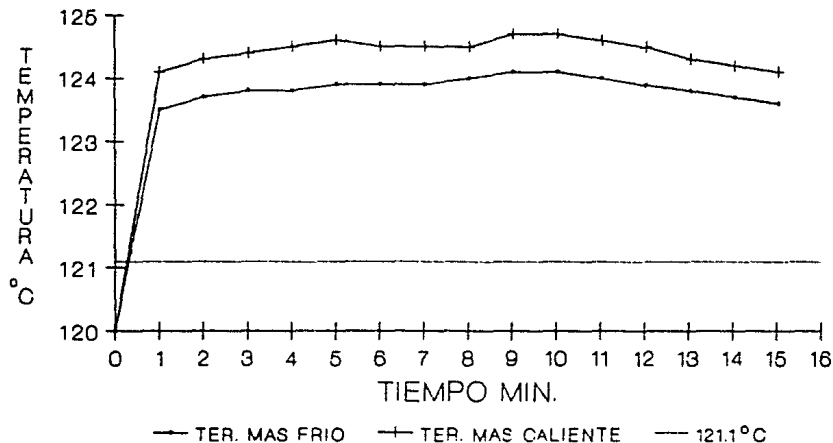


- Amplitud máxima entre la temperatura promedio del proceso y la temperatura mínima 0.66 C.

Todos los resultados obtenidos están dentro de los criterios de aceptacion.

Con los datos del cuadro 4 se construyó la gráfica 2 para observar el perfil térmico máximo y mínimo del proceso.

# DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA VACIA



### 2.3 Tercera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de trabajo 124 C.
- Tiempo de esterilización 15 minutos.
- Presión de trabajo 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

En el cuadro 5 se observan los resultados de la tercera corrida donde se muestra la temperatura promedio, en cada tiempo de registro así como la temperatura mínima registrada y la amplitud entre estos datos, al final del cuadro se muestra la temperatura promedio de todo el proceso.

Cuadro 5

Tiempo	Temperatura ( C ) x̄	Temperatura o mínima C	Amplitud o C
1	124.23	124.00	0.23
2	124.71	124.50	0.21
3	124.55	124.30	0.25
4	124.51	124.30	0.21
5	124.48	124.20	0.28
6	124.57	124.30	0.27
7	124.65	124.40	0.25
8	124.73	124.50	0.23
9	124.42	124.20	0.22
10	124.20	124.00	0.20
11	124.08	124.80	0.72
12	124.01	123.80	0.21
13	123.95	123.80	0.15
14	123.83	123.70	0.13
15	123.76	123.60	0.16

$$\bar{x} = 124.31$$

En el cuadro 6 se muestran las lecturas de las temperaturas mínima y máxima en cada tiempo de registro así como el termopar que la registra, también la amplitud de estos termopares en cada uno de los tiempos registrados durante todo el proceso.

Cuadro 6

Tiempo	Tempe- ratura	Termo- par	Tempe- ratura	Termo- par	Amplitud
	° C		° C		° C
	mínima	No	máxima	No	
1	124.0	3	124.6	7	0.60
2	124.5	3	125.0	7	0.50
3	124.3	3	124.8	8	0.50
4	124.3	3	124.8	7	0.50
5	124.2	3	124.7	7	0.50
6	124.3	3	124.9	8	0.60
7	124.4	3	124.9	7	0.50
8	124.5	3	125.0	7	0.50
9	124.2	3	124.8	7	0.60
10	124.0	3	124.6	7	0.60
11	123.8	3	124.5	7	0.70
12	123.8	3	124.4	7	0.60
13	123.6	2	124.5	7	0.70
14	123.7	2	124.3	7	0.60
15	123.6	3	124.2	7	0.60

A continuación se informa de los resultados que nos determinan si la corrida fue satisfactoria:

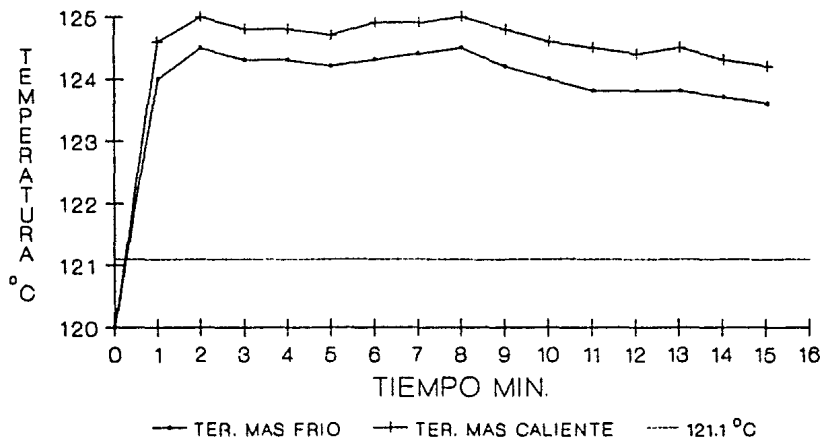
- Temperatura máxima durante el proceso 125.0 C.
- Temperatura mínima durante el proceso 123.6 C.
- Amplitud máxima entre los termopares 1.4 C.

- Amplitud máxima entre la temperatura promedio de todo el proceso  
y la temperatura mínima 0.71 C.

Todos los resultados obtenidos están dentro de los criterios de aceptación.

Con los datos del cuadro 6 se construyó la gráfica 3 para observar el perfil térmico máximo y mínimo del proceso.

# DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA VACIA



TERCERA CORRIDA

GRAFICA No. 3

A continuación se muestra en el cuadro 7 los resultados obtenidos de las tres corridas de distribución de calor en cámara vacía:

Cuadro 7			
Corrida	Primera	Segunda	Tercera
Temperatura mayor durante el proceso Termopar.	124,7 C 10	124,7 C 9	125,0 C 7
Temperatura menor durante el proceso Termopar	123,8 C 1	123,5 C 1	123,6 C 3
Amplitud máxima entre los termopares	0,9 C	1,2 C	1,4 C
Amplitud máxima - de $\bar{x} - T$ mínima	0,44 C	0,66 C	0,71 C

De acuerdo a los resultados obtenidos el punto frío se localiza en la posición del termopar 1 y la amplitud obtenida de la temperatura promedio de todo el proceso respecto a la temperatura mínima en cada corrida está dentro de los criterios de aceptación; también la amplitud máxima obtenida entre los termopares está dentro de los criterios de aceptación.

A continuación se muestra en el cuadro B los datos de las temperaturas promedio por termopar, obtenidas en las tres corridas para efectuarle un análisis de la varianza y ver la reproducibilidad de la distribución de calor del proceso de esterilizaci6n.

-----  
 Cuadro B  
 -----

	corrida		
	1	2	3
termopar	$\bar{x}^{\circ}$ ( C )	$\bar{x}^{\circ}$ ( C )	$\bar{x}^{\circ}$ ( C )
1	124.00	123.84	124.29
2	124.04	124.21	124.18
3	124.12	124.05	124.10
4	124.10	123.92	124.23
5	124.21	124.00	124.22
6	124.19	124.24	124.34
7	124.29	124.07	124.65
8	124.35	124.34	124.50
9	124.12	124.34	124.24
10	124.35	124.30	124.19

-----

Resultados del análisis de la varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculada	F tablas	
Entre corridas	.1412	2	.0706	2.84	.01	.05
Dentro de corridas	.6723	27	.0249		5.49	3.35

-----



La zona de aceptación esta definida por la F de tablas con una confianza del 1 o 5 por ciento, el resultado obtenido de la F calculada es de 2.84 que es menor a los resultados obtenidos en tablas.

Los resultados obtenidos demuestran que la temperatura en las tres corridas es reproducible.

### 3. DISTRIBUCION DE CALOR EN CAMARA CON CARGA

#### 3.1 Primera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de trabajo 124 °C.
- Tiempo de esterilización 15 minutos.
- Presión de trabajo 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

En el cuadro 9 se observan los resultados de la primera corrida donde se muestra la temperatura promedio, en cada tiempo de registro así como la temperatura mínima registrada y la amplitud entre estos datos; al final del cuadro se muestra la temperatura promedio de todo el proceso.

-----  
Cuadro 9  
-----

Tiempo	Temperatura (°C) $\bar{x}$	Temperatura o mínima °C	Amplitud o °C
1	125.19	124.80	0.39
2	123.46	122.60	0.86
3	123.24	122.50	0.74
4	123.70	123.20	0.50
5	124.45	123.90	0.55
6	124.47	123.90	0.57
7	124.36	123.90	0.46
8	124.31	123.80	0.51
9	124.29	123.80	0.49
10	124.30	123.90	0.40
11	124.35	123.90	0.45
12	124.45	124.00	0.45
13	124.62	124.20	0.42
14	124.73	124.30	0.43
15	124.51	124.10	0.41

-----

$$\bar{\bar{x}} = 124.30$$

En el cuadro 10 se muestran las lecturas de las temperaturas mínima y máxima en cada tiempo de registro así como el termopar que la registra; también la amplitud de estos termopares en cada uno de los tiempos registrados durante todo el proceso.

Cuadro 10					
Tiempo	Tempe- ratura ° C	Termo- par	Tempe- ratura ° C	Termo- par	Amplitud ° C
	mínima	No	máxima	No	
1	124.8	2	125.8	8	1.00
2	122.6	2	124.1	8	1.50
3	122.5	2	123.9	9	1.40
4	123.2	2	124.3	8	1.10
5	123.9	2	125.2	7	1.30
6	123.9	2	125.1	8	1.20
7	123.9	2	125.0	8	1.10
8	123.8	2	125.0	7	1.20
9	123.8	2	125.0	8	1.20
10	123.9	2	125.0	8	1.10
11	123.9	2	125.0	7	1.10
12	124.0	2	125.2	10	1.20
13	124.2	2	125.3	10	1.10
14	124.3	5	125.3	7	1.00
15	124.1	5	125.2	7	1.10

A continuación se informa de los resultados que nos permiten determinar si la corrida fue satisfactoria:

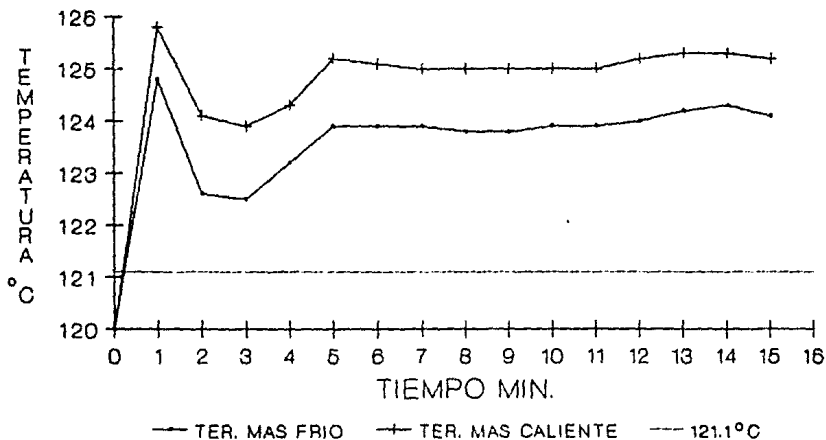
- Temperatura máxima durante el proceso 125.8 C.
- Temperatura mínima durante el proceso 122.5 C.
- Amplitud máxima entre los termopares 3.3 C.

- Amplitud máxima entre la temperatura promedio de todo el proceso  
y la temperatura mínima 1.80 C.

Todos los resultados obtenidos están dentro de los criterios de aceptación.

Con los datos del cuadro 10 se construyó la gráfica 4 para observar el perfil térmico máximo y mínimo del proceso.

# DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA CON CARGA



PRIMERA CORRIDA

GRAFICA No. 4

### 3.2 Segunda corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura de trabajo 124 °C.
- Tiempo de esterilización 15 minutos.
- Presión de trabajo 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

En el cuadro 11 se observan los resultados de la segunda corrida donde se muestra la temperatura promedio, en cada tiempo de registro así como la temperatura mínima registrada y la amplitud entre estos datos; al final del cuadro se muestra la temperatura promedio de todo el proceso.

Cuadro 11

Tiempo	Temperatura (°C) x̄	Temperatura mínima C	Amplitud C
1	123.74	123.50	0.24
2	123.90	123.70	0.20
3	123.96	123.70	0.26
4	124.00	123.80	0.20
5	124.11	123.90	1.21
6	124.03	123.80	0.23
7	124.05	123.80	0.25
8	124.04	123.80	0.24
9	124.06	123.80	0.26
10	124.12	123.80	0.32
11	124.03	123.70	0.33
12	123.83	123.50	0.33
13	123.64	123.30	0.34
14	123.40	123.00	0.40
15	123.22	122.80	0.42

$$\bar{x} = 123.67$$

En el cuadro 12 se muestran las lecturas de las temperaturas mínima y máxima en cada tiempo de registro así como el termopar que la registra, también la amplitud de estos termopares en cada uno de los tiempos registrados durante todo el proceso.

-----  
Cuadro 12  
-----

Tiempo	Tempe- ratura	Termo- par	Tempe- ratura	Termo- par	Amplitud
	° C	No	° C	No	° C
	mínima		máxima		
1	123.5	2	124.1	7	0.60
2	123.7	2	124.3	7	0.60
3	123.7	2	124.3	7	0.60
4	123.8	2	124.3	10	0.50
5	123.9	2	124.5	7	0.60
6	123.8	2	124.4	7	0.60
7	123.8	2	124.4	10	0.60
8	123.8	1	124.4	7	0.60
9	123.8	4	124.4	7	0.60
10	123.8	4	124.5	7	0.70
11	123.7	4	124.4	7	0.70
12	123.5	4	124.2	7	0.70
13	123.3	2	124.0	7	0.70
14	123.0	4	123.8	7	0.80
15	122.6	2	123.6	7	0.80

-----

A continuación se informa de los resultados que nos permiten determinar si la corrida fue satisfactoria:

- Temperatura máxima durante el proceso 124.5 °C.
- Temperatura mínima durante el proceso 122.6 °C.
- Amplitud máxima entre los termopares 1.7 °C.

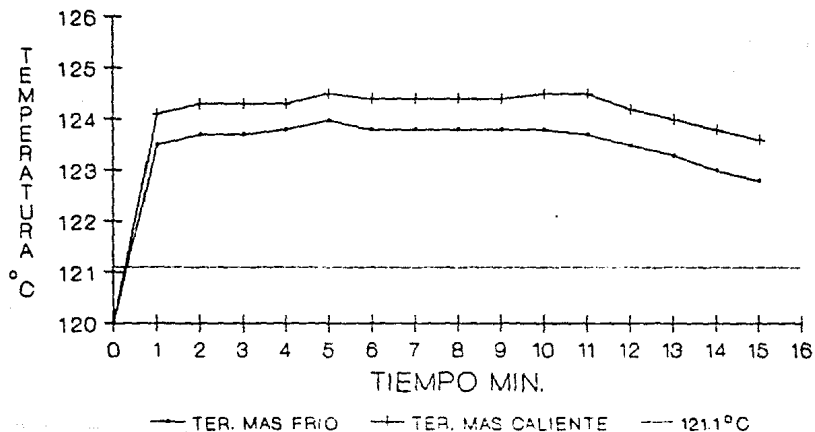
- Amplitud máxima entre la temperatura promedio del proceso y la temperatura mínima 1.07 C.

Todos los resultados obtenidos están dentro de los criterios de aceptación.

Con los datos del cuadro 12 se construyó la gráfica 5 para observar el perfil térmico máximo y mínimo del proceso.



# DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA CON CARGA



SEGUNDA CORRIDA

GRAFICA No. 5



En el cuadro 14 se muestran las lecturas de las temperaturas mínima y máxima en cada tiempo de registro así como el termopar que la registra, también la amplitud de estos termopares en cada uno de los tiempos registrados durante todo el proceso.

-----  
Cuadro 14  
-----

Tiempo	Tempe- ratura	Termo- par	Tempe- ratura	Termo- par	Amplitud
	o C		o C		o C
	mínima	No	máxima	No	
1	123.5	3	124.3	8	0.80
2	123.6	1	124.4	8	0.80
3	123.7	1	124.5	8	0.80
4	123.6	3	124.5	7	0.90
5	123.7	4	124.6	7	0.90
6	123.9	4	124.6	8	0.70
7	123.8	3	124.8	9	1.00
8	123.8	3	124.8	8	1.00
9	123.8	3	124.9	7	1.10
10	123.9	3	124.9	7	1.00
11	123.9	3	125.0	7	1.10
12	123.9	3	125.0	7	1.10
13	124.0	3	125.1	7	1.10
14	124.1	2	125.4	7	1.30
15	123.8	3	124.8	7	1.00

-----

A continuación se informa de los resultados que nos determinan si la corrida fue satisfactoria:

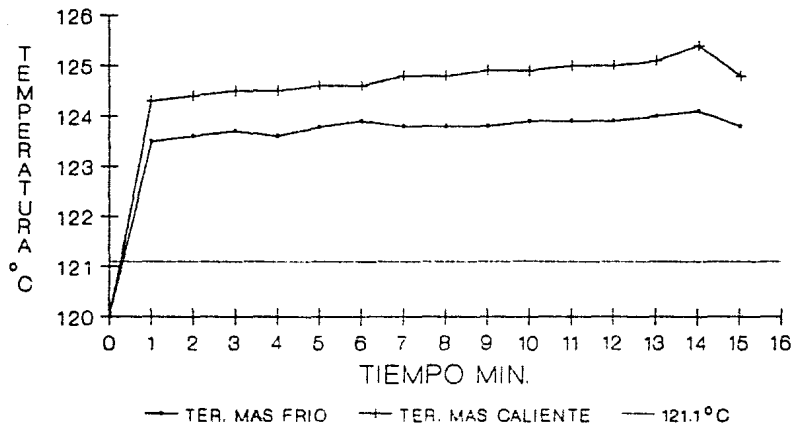
- Temperatura máxima durante el proceso 125.4 C.
- Temperatura mínima durante el proceso 123.5 C.
- Amplitud máxima entre los termopares 1.9 C.

- Amplitud máxima entre la temperatura promedio de todo el proceso  
y la temperatura mínima 0.71 C.

Todos los resultados obtenidos están dentro de los criterios de  
aceptación.

Con los datos del cuadro 14 se construyó la gráfica 6 para  
observar el perfil térmico máximo y mínimo del proceso.

# DISTRIBUCION DE CALOR CAMARA CON CARGA



TERCERA CORRIDA

GRAFICA No. 8

A continuación se muestra en el cuadro 15 los resultados obtenidos de las tres corridas de distribución de calor en cámara con carga.

Cuadro 15			
Corrida	Primera	Segunda	Tercera
Temperatura mayor durante el proceso Termopar.	125.8 C 8	124.5 C 7	125.4 C 7
Temperatura menor durante el proceso Termopar	122.5 C 2	122.8 C 2	123.5 C 3
Amplitud máxima entre los termopares	3.3 C	1.7 C	1.9 C
Amplitud máxima de $X - T_{\text{mínima}}$	1.80 C	1.07 C	0.71 C

De acuerdo a los resultados obtenidos el punto frío se localiza en la posición del termopar 2 y la amplitud obtenida de la temperatura promedio de todo el proceso respecto a la temperatura mínima en cada corrida está dentro de los criterios de aceptación; también la amplitud máxima obtenida entre los termopares está dentro de los criterios de aceptación.

A continuación se muestra en el cuadro 16 los datos de las temperaturas promedio por termopar, obtenidas en las tres corridas para efectuarle un análisis de la varianza y ver la reproducibilidad de la distribución de calor del proceso de esterilización.

Cuadro 16			
corrida			
	1	2	3
termopar	$\bar{x}^{\circ}$ ( C )	$\bar{x}^{\circ}$ ( C )	$\bar{x}^{\circ}$ ( C )
1	124.12	123.64	124.02
2	123.80	123.60	124.10
3	124.06	123.66	123.82
4	124.01	123.69	123.88
5	123.90	123.63	124.16
6	124.02	123.90	124.24
7	124.54	124.22	124.50
8	124.73	123.98	124.27
9	124.44	123.89	124.27
10	124.41	124.19	124.28
$\bar{x}$	124.203	123.08	124.154

Resultados del análisis de la varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados calculada	F	F tablas
Entre corridas	.7759	2	.3859	6.10	.01 .05 5.49 3.35
Dentro de corridas	1.7093	27	.0633		

Los resultados obtenidos demuestran el efecto de la carga en la distribución de calor ya que el resultado a contrastar es el valor de  $F$  calculado con el valor de  $F$  de tablas y se observa que el valor de  $F$  calculado es mayor que el valor  $F$  de tablas, se observa también que el valor mínimo obtenido de temperatura es en la corrida 2 con un valor de  $123.08\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Este resultado es apesar del efecto de la carga mayor a los  $121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que es la temperatura teórica para la condición de sobrematanza.



#### 4 ESTUDIOS DE PENETRACION DE CALOR.

##### 4.1 Primera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura 124 °C.
- Tiempo 15 minutos.
- Presión 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Termopar	Fo (minutos)
1	21.30
2	22.71
3	25.78
4	22.13
5	21.41

A continuación se muestra en la tabla 7 los datos obtenidos por el termopar 1 y el 3 que son el Fo más bajo y el más alto respectivamente.

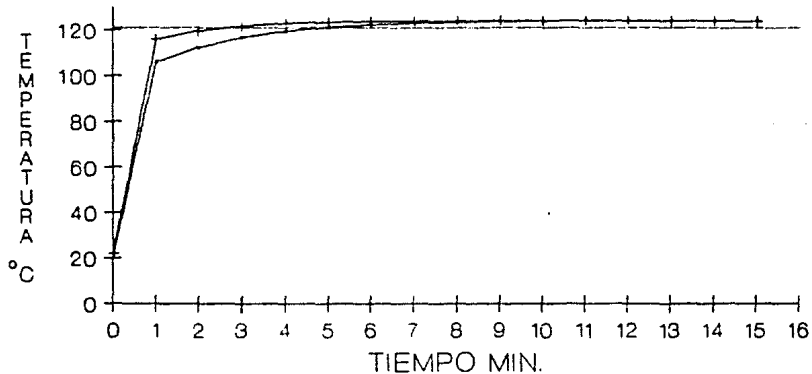
CUADRO 17

Termopar

	1	3
	°	
Tiempo	Temperatura C	
1	106.0	116.1
2	112.4	119.7
3	116.7	121.8
4	119.5	122.9
5	121.3	123.5
6	122.4	123.8
7	123.1	124.0
8	123.5	124.1
9	123.9	124.2
10	124.1	124.2
11	124.3	124.2
12	124.1	124.1
13	124.1	124.0
14	124.0	124.0
15	124.0	123.9

A continuacion se muestra la grafica con los datos del cuadro 17, para observar el comportamiento termico del proceso.

# PENETRACION DE CALOR PERFIL TERMICO



— TERMOPAR 1    —+— TERMOPAR 3    - - - 121.1°C

PRIMERA CORRIDA

GRAFICA No. 7

#### 4.2 Segunda corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura 124 °C.
- Tiempo 15 minutos.
- Presión 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Termopar	Fo (minutos)
1	19.66
2	15.31
3	17.50
4	14.41
5	15.93

A continuación se muestra en el cuadro 18 los datos obtenidos por el termopar 4 y el 1 que son el Fo más bajo y el más alto respectivamente.

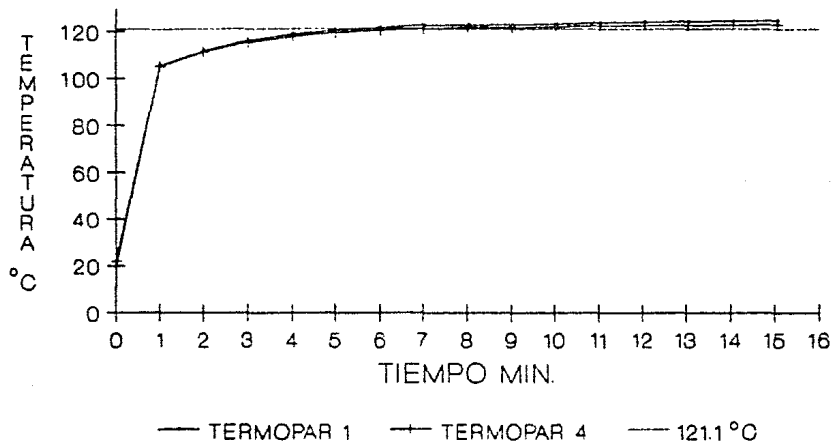
CUADRO 18

Termopar

Tiempo	Temperatura °C	
	1	4
1	105.5	105.1
2	111.7	111.2
3	116.0	115.3
4	118.7	117.9
5	120.3	119.4
6	121.5	120.4
7	122.6	121.1
8	122.8	121.6
9	123.0	121.9
10	123.2	122.1
11	123.6	122.3
12	124.0	122.5
13	124.2	122.6
14	124.4	122.8
15	124.7	122.9

Con estos datos se construyó la gráfica 8 para observar el perfil térmico del proceso de la segunda corrida.

# PENETRACION DE CALOR PERFIL TERMICO



SEGUNDA CORRIDA

GRAFICA No. 8

#### 4.3 Tercera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura 124 C.
- Tiempo 15 minutos.
- Presión 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Termopar	F <sub>o</sub> (minutos)
1	27.63
2	17.83
3	23.94
4	17.42
5	16.75

A continuación se muestra en el cuadro 19 los datos obtenidos por el termopar 5 y el 1 que son el F<sub>o</sub> más bajo y el más alto respectivamente.

-----  
 CUADRO 19  
 -----

Termopar

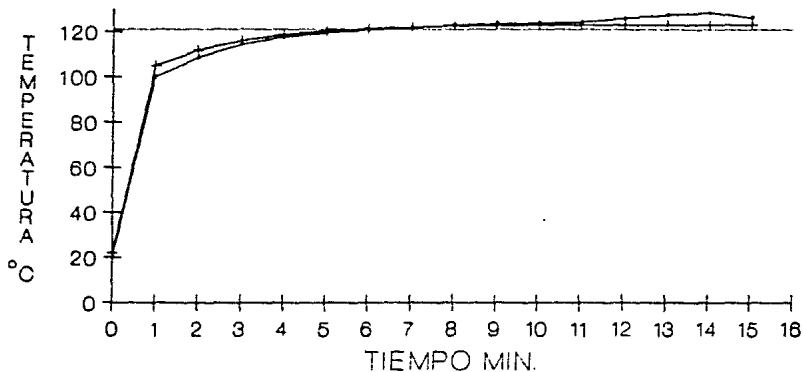
	1	5
Tiempo	D	
	Temperatura C	
1	99.9	103.0
2	108.6	111.8
3	114.3	116.0
4	117.6	118.7
5	119.5	120.4
6	120.9	121.4
7	121.9	122.0
8	122.9	122.5
9	123.5	122.8
10	123.9	122.9
11	124.2	123.0
12	126.0	123.0
13	127.4	123.0
14	128.5	123.1
15	126.4	123.1

-----

En la grafica 9 se observa el comportamiento termico del proceso de la tercera corrida construida con los datos del cuadro 19.



# PENETRACION DE CALOR PERFIL TERMICO



— TERMOPAR 1    —+— TERMOPAR 5    --- 121.1 °C

TERCERA CORRIDA

GRAFICA No. 9

A continuación se muestra en el cuadro 20 los resultados de los  $F_0$  de las tres corridas de penetración de calor.

CUADRO 20

Sitio	Corrida		
	1 F <sub>0</sub> (min)	2 F <sub>0</sub> (min)	3 F <sub>0</sub> (min)
1	21.30	19.66	27.63
2	22.71	15.31	17.83
3	25.78	17.50	23.94
4	22.13	14.41	17.42
5	21.41	15.93	16.75

De acuerdo a los resultados obtenidos en las tres corridas y que se resumen en la tabla anterior, no se obtuvo un solo valor de  $F_0$  por abajo de los 12 minutos, con lo cual todos los resultados entran en los criterios de aceptación.

A los mismos datos se les hizo un análisis de la varianza, considerando un diseño en bloques al azar (como bloque, la corrida) encontrándose los siguientes resultados:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculada	F tablas
Sitio	71.5106	4	17.8777	2.74	(.05) 3.84 (.01) 7.01
Corrida (Bloque)	97.1803	2	48.5901		
Error	52.1139	8	6.5142		

El análisis de la varianza no muestra un efecto significativo del sitio sobre el valor de  $F_0$  (proceso reproducible), ya que la zona de aceptación esta delimitada por el valor de  $F$  de tablas con una confianza del 1 ó 5 % y el valor de  $F$  obtenido es menor al de tablas cayendo por lo tanto en la zona de aceptación.

Aplicando la siguiente formula se verifica que el proceso es reproducible(5): (Punto 3 del Apndice)

$$F_0 = \bar{x} - \frac{Sx}{\sqrt{n}} \quad t$$

Sustituyendo valores tenemos:

$$F_0 = 17.4866 - \frac{2.5523}{3} \quad 2.31$$

$$F_0 = 14.0826$$

Con este resultado se verifica que hay más del 95% de nivel de confianza en que el promedio de los valores mínimos de  $F_0$  serán mayores que el valor  $F_0$  requerido de 12 minutos.

## 5 PRUEBAS DE BIODIEBATIO

### 5.1 Primera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura 124 C.
- Tiempo 15 minutos.
- Presión 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos después del periodo de incubación para los bioindicadores son los siguientes:

Bioindicador	Condiciones de incubación		Resultado
	Tiempo	Temperatura	
sterikon	48 horas	55 C	negativo
control +	48 horas	55 C	positivo
duo-spore	7 días	55 C	negativo
control +	7 días	55 C	positivo

En el sterikon no hubo cambio en su aspecto físico, la tira de duo-spore no tuvo crecimiento en el medio de cultivo después del tiempo y las condiciones de incubación, no así sus respectivos controles que dieron positivos.

### 5.1 Segunda corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura 124 C.
- Tiempo 15 minutos.
- Presión 1.65 kg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos después del periodo de incubación para los bioindicadores son los siguientes:

Bioindicador	Condiciones de incubación		Resultado
	Tiempo	Temperatura	
sterikon	48 horas	55 C	negativo
control +	48 horas	55 C	positivo
duo-spore	7 días	55 C	negativo
control +	7 días	55 C	positivo

En el sterikon no hubo cambio en su aspecto físico, la tira de duo-spore no tuvo crecimiento en el medio de cultivo después del tiempo y las condiciones de incubación, no así sus respectivos controles que dieron positivos.

### 5.1 Tercera corrida.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- Temperatura 124 °C.
- Tiempo 15 minutos.
- Presión 1.65 Kg/cm<sup>2</sup>.

Los resultados obtenidos después del periodo de incubación para los bioindicadores son los siguientes:

Bioindicador	Condiciones de incubación		Resultado
	Tiempo	Temperatura	
sterikon	48 horas	55 °C	negativo
control +	48 horas	55 °C	positivo
duo-spore	7 días	55 °C	negativo
control +	7 días	55 °C	positivo

En el sterikon no hubo cambio en su aspecto físico, la tira de duo-spore no tuvo crecimiento en el medio de cultivo después del tiempo y las condiciones de incubación, no así sus respectivos controles que dieron positivos.

En las pruebas de biodesaño efectuadas durante los estudios, no se observó crecimiento en los bioindicadores utilizados para este fin, después del tiempo indicado de incubación.

En los testigos positivos se observó crecimiento después del tiempo indicado de incubación en las 3 pruebas desarrolladas. Con este resultado se muestra la eficiencia del proceso.

## IX. CONCLUSIONES

1. De los estudios de cámara vacía se concluye que de acuerdo a los resultados obtenidos, el autoclave distribuye de manera homogénea el calor. Y la amplitud del punto frío en las tres corridas es aceptable, ya que está dentro de los criterios de aceptacibn.

Se utilizaron 10 termopares en los estudios de distribución de calor, siempre conservando este número de termopares y su colocacibn.

2. Aunque no hay mucha bibliografía escrita respecto a los estudios de cámara con carga, estos se hacen principalmente para observar el efecto de la carga en la localización del punto frío. Se observa en este estudio como es influenciado por el patrón de carga empleado, ya que el punto frío cambia de posicibn respecto a los estudios con cámara vacía.

A pesar del efecto de la carga, se cumplen los criterios de aceptacibn, concluyendo que el autoclave distribuye de manera homogénea el calor.

3. Para los estudios de penetración de calor se monitorearon las tres posiciones del patrón de carga pero principalmente la posición B con tres termopares, aquí se localizó el punto frío con el patrón de carga, obteniéndose buenos resultados, ya que no se obtuvo un solo valor de  $F_0$  por abajo de los 12 minutos.



Se concluye que el proceso proporciona suficiente calor para obtener valores de  $F_0$  por arriba de los 12 minutos, es decir proporciona una reducción de 12 logaritmos para microorganismos que tengan un valor de  $D$  de 1 minuto.

4. Con los estudios de biodesaño se refuerzan los resultados obtenidos en los estudios de penetración, ya que se comprueba prácticamente la eficiencia del proceso de esterilización con vapor por medio de la inactivación de los bioindicadores, en las 3 corridas.

5. La validación del proceso se considera aceptable ya que se cumplió con todos los objetivos planteados durante el inicio del trabajo.

X. APENDICE

1.- A continuación se muestra la tabla de Analisis de la Varianza para un diseño completamente al azar con un criterio de clasificación, que se utilizó para el tratamiento de los datos obtenidos en los estudios de distribución de calor en cámara vacía y cámara llena.

C O R R I D A

termopar	1	2	3
1	Y 1,1	Y 2,1	Y 3,1
2	Y 1,2	Y 2,2	Y 3,1
3	Y 1,3	Y 2,3	Y 3,1
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
10	Y 1,10	Y 2,10	Y 3,10

TOTALES C1                    C2                    C3                    : T GRAN TOTAL

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de Variación :	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre Corridas :	$C1^2 + C2^2 + C3^2 - \frac{T^2}{10}$	$3 - 1$
Dentro de Corridas :	$Y11^2 + Y12^2 + \dots + Y310^2 - \frac{\sum C_i^2}{10}$	$c(10 - 1)$

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

Media de Cuadrados		F	F
		calculada	tablas
SC		MC	
EC		EC	F
MC = $\frac{SC}{EC}$	gl	MC	gl, gl
EC	EC	DC	EC DC
SC			
DC			F
MC = $\frac{SC}{DC}$	gl		gl, gl
DC	DC		EC DC

2.- A continuación se muestra la tabla de Analisis de la Varianza para un diseño en bloques al azar con un criterio de clasificación que se utilizó para el tratamiento de los datos obtenidos en los estudios de penetración de calor.

C O R R I D A

sitio	C O R R I D A			TOTALES
	1	2	3	
1	Y 1,1	Y 2,1	Y 3,1	S 1
2	Y 1,2	Y 2,2	Y 3,2	S 2
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
5	Y 1,5	Y 2,5	Y 3,5	S 5
TOTALES	C 1	C 2	C 3	T : T GRAN TOTAL

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION:	SUMA	DE	CUADRADOS
SITIO	SC =	$\frac{2^2 + 2^2 + \dots + 2^2}{3}$	$\frac{2}{15}$
CORRIDA (BLOQUE)	SC =	$\frac{2^2 + 2^2 + 2^2}{5}$	$\frac{2}{15}$
ERROR	SC =	$\frac{2^2 + 2^2 + 2^2 + 2^2 + 2^2 + \dots + 2^2}{35}$	$\frac{2}{15}$

GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CAL.	F TABLAS
gl = 4 S	SC <sub>s</sub> MC = $\frac{SC_s}{S}$ gl	MC S E	F gl, gl S E
gl = 2 C	SC <sub>c</sub> MC = $\frac{SC_c}{C}$ gl		
gl = 8 E	SC <sub>e</sub> MC = $\frac{SC_e}{E}$ gl		

3.- Formula para evaluar la reproducibilidad de los estudios de penetración de calor (5).

$$F_0 = \bar{x} - \frac{S_x}{\sqrt{n}} \cdot t$$

Donde:

$\bar{x}$  = promedio de los valores mínimos de  $F_0$  de las tres corridas.

$S_x$  = desviación estándar.

$n$  = número de valores de  $F_0$ .

$t$  = valor  $t$  de student.

## **XI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda hacer un plan de monitoreo trimestral para dar un seguimiento a todos los parámetros del proceso, y verificar que sigan dentro de los límites de aceptación.

En este proceso el vapor entra en contacto con el producto a esterilizar por lo tanto se hace necesaria la calificación de las instalaciones del sistema generador y distribuidor del vapor.

Se recomienda respetar el patrón de carga de los medios de cultivo en todas las corridas del proceso. Si por alguna razón se cambia este patrón de carga es necesario revalidar el proceso con el nuevo patrón de carga.

## III. BIBLIOGRAFIA

1. Carleton, F. J. and Agalloco, J. P. Validation of Aseptic Pharmaceutical. New York. 1986.
2. Parenteral Drug Association. Inc. Tech Mon. 2. Validation of Aseptic Filling for Solution Drug Products.
3. Loftus, B. T. and Nash, R. A. Pharmaceutical Process Validation. New York, 1984.
4. Dell, A. L. Pharmaceutical Manufacturing Enviroments Pharmaceutical Tecnology 3 (6), 396 (1979).
5. Validation of Steam Sterilization Cycles. Technical Monograph No. 1, Parenteral Drug Association, Inc, 1978.
6. Román G. F. Validación de Procesos para Productos Farmacéuticos no Estériles, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 18(3) Septiembre 1987.
7. Angelina Peña R. Validación de Procesos. Seminario de Validación de Métodos y Procesos Vitrium S. A. de C. v., Mayo de 1983.
8. Apuntes del II Taller Internacional de Validación, Agosto de 1989, Asociasibn Farmacéutica Mexicana.

9. Richard D. Rooney. Steam Sterilizer Design and GMP Compliance, Pharmaceutical Engineering, January-February 1984.
10. M.R. Breach, Esterilización, Métodos y Control, Ed. El Manual Moderno, S. A. Mexico D. F. 1972.
11. Paul L. Simmons. Sterilizer Validation. Pharmaceutical Technology, April 1979 vol 3(4).
12. J. Dony et. al. Sterility Assurance Based on Validation of the Sterilization Process Using Steam Under Pressure. Journal of Parenteral Science and Technology, vol. 43 No. 5 September-October 1989.
13. Ronald F. T. Regulatory Aspects of Aseptic Processing, Pharm. Tech. Conference. Food and Drug Administration, Atlanta Georgia 30309.
14. PMA 'S VALIDATION ADVISORY COMMITTEE. Process Validation Concepts for Drug Products. Pharmaceutical Technology.
15. Comité de Redacción de Guías Generales de Validación. Proyecto de Norma Técnica que establece las Guías Generales de Validación. Dirección General de Control de Insumos para la Salud, S.S.A.