

VALIDACIÓN DEL PROCESO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE EQUIPOS  
DE LA PLANTA DE FITOTERAPEUTICOS DEL LABORATORIO LABFARVE

ENNA LORENA ARDILA TRASLAVIÑA  
Estudiante de décimo semestre  
Programa de Microbiología

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
COLOMBIA  
2016

VALIDACIÓN DEL PROCESO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE EQUIPOS  
DE LA PLANTA DE FITOTERAPEUTICOS DEL LABORATORIO LABFARVE

ENNA LORENA ARDILA TRASLAVIÑA  
Estudiante de Décimo Semestre  
Programa de Microbiología

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar al título de  
MICROBIOLOGA

Asesora  
Fanny Herrera Arias, Ph D

Asesora externa  
Leidy Barajas Villamizar, Esp

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
COLOMBIA  
2016

Nota de aceptación

---

---

---

---

Firma Del Jurado

---

Firma Del Jurado

Pamplona, Diciembre13 de 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por haberme permitido culminar con éxito esta etapa de mi vida, a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y a mi hijo por ser la motivación día a día para seguir adelante.

Agradezco al Laboratorio de Farmacología Vegetal LABFARVE por haber hecho posible la realización de este proyecto.  
Especialmente a la Microbióloga Esp. Leydi Barajas y al Ph.D. John Hernández por su ayuda, dedicación e interés,

***“La recompensa del trabajo bien hecho, es la oportunidad de hacer más trabajo bien hecho”***

Jonas Edward Salk



equipo en estado limpio y Tiempo de permanencia del equipo en estado sucio).....	26
3.3.6.    Métodos analíticos y de muestreo en la validación.....	27
3.3.7.    Análisis del riesgo.....	27
3.3.8. Laboratorio LABFARVE.....	30
4. METODOLOGÍA.....	31
4.1. PRERREQUISITOS.....	32
4.2. ANÁLISIS DEL RIESGO, EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y EQUIPOS Y SELECCIÓN DEL PEOR CASO Y ENSAYOS A ESCALA DE LABORATORIO.....	34
4.2.1.    Failure Mode and Effects Analysis (FMEA).....	34
4.2.2.    Evaluación de los equipos y selección de los peores casos.....	35
4.2.3.    Criterios para la evaluación de los peores casos de los equipos.....	36
4.3. PRUEBA DE CALIFICACIÓN DEL DETERGENTE Y LOS DIFERENTES DESINFECTANTES.....	37
4.3.1. Procedimiento para el manejo de los microorganismos de referencia KWIK-STIK.....	38
4.3.2. Procedimiento para la conservación de los microorganismos en Cryobank.....	40
4.3.3. Aislamiento y caracterización de la cepa nativa.....	40
4.3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana del detergente y los desinfectantes.....	40
4.3.5.    Método del coeficiente Fenólico USP según la AOAC 955.11.....	41

4.3.6. Método de Sensibilidad antimicrobiana (Kirby-Bauer) (AOAC, 2000).....	42
4.3.7. Método de la dilución de uso AOAC .....	955.15
.....	43
4.3.7.1 Preparación de los cultivos de prueba .....	43
4.3.7.2 Desarrollo del método.....	44
<b>4.4. EVALUACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE LOS EQUIPOS.....</b>	<b>47</b>
4.4.1. Ensayos del porcentaje de recobro en las diferentes superficies de los equipos. ....	47
4.4.2. Ensayo de porcentaje de recobro de microorganismos.....	48
<b>4.5. PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y FISICOQUÍMICOS.....</b>	<b>50</b>
4.5.1. Parámetros microbiológicos.....	50
4.5.2. Parámetros químicos.....	50
4.5.3. Determinación de los límites de residuos de producto, detergente y desinfectantes.....	50
<b>4.6. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD).....</b>	<b>51</b>
4.6.1. Metodología general CCD.....	51
<b>4.7. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL DETERGENTE Y DE LOS DESINFECTANTES.....</b>	<b>53</b>
4.7.1. Conductividad de los productos.....	53
4.7.2. Conductividad del detergente y desinfectantes.....	53
<b>4.8. MUESTREO EN PLANTA.....</b>	<b>54</b>
4.8.1. Análisis microbiológico de aerobios mesófilos, Coliformes totales, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y mohos y Levaduras.....	54
4.8.2. Análisis de conductividad y TOC.....	55
<b>4.9. ANÁLISIS DE TIEMPOS DE PERMANENCIA SUCIO.....</b>	<b>56</b>
<b>4.10. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL DETERGENTE Y LOS</b>	

<b>DESINFECTANTES A TRAVÉS DEL TIEMPO</b> .....	56
<b>4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	56
<b>5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b> .....	57
<b>6. RESULTADOS</b> .....	58
<b>6.1. ANÁLISIS DEL RIESGO EN EL PROCESO DE LIMPIEZA</b> .....	58
<b>6.2. DESCRIPCIÓN DE EQUIPOS</b> .....	59
<b>6.2.1. Utensilios empleados en la fabricación de los productos</b> .....	60
<b>6.3. Características de los equipos</b> .....	60
<b>6.4. SELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE TOMA DE MUESTRA DE RESIDUOS</b> .....	62
<b>6.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DETERGENTE Y LOS DESINFECTANTES</b> .....	66
<b>6.5.1. Resultados método coeficiente fenólico</b> .....	67
<b>6.5.2. Resultados método de difusión en agar (Técnica Kirby –Buaer)</b> .....	67
<b>6.5.3. Resultados método de la dilución de uso AOAC 955.15</b> .....	70
<b>6.5.4. Ensayo de porcentaje de recuperación de producto</b> .....	71
<b>6.5.5. Resultados Ensayo porcentaje de recobro de microorganismos</b> .....	73
<b>6.6. LÍMITE DE RESIDUOS ACEPTABLE DE PRODUCTOS, DETERGENTE Y DESINFECTANTE</b> .....	75
<b>6.6.1. Ensayos del principio activo rutina</b> .....	77
<b>6.6.2. Ensayo del principio activo rutina en agua purificada</b> .....	78
<b>6.7. CURVA DE CALIBRACION DE CONDUCTIVIDAD Y PH DEL DETERGENTE, DESINFECTANTES Y PRODUCTOS</b> .....	78
<b>6.8. INSTRUCTIVOS ESTABLECIDOS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE EQUIPOS</b> .....	83
<b>6.9. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LA PLANTA DE FITOTERAPÉUTICOS</b> .....	84
<b>6.9.1. Resultados de pH de las aguas de enjuague de los equipos</b> .....	86
<b>6.9.2. Resultados de conductividad de las aguas de enjuague de los equipos</b> ....	87
<b>6.9.3. Resultados de TOC de las aguas de enjuague de los equipos</b> .....	88
<b>6.9.4. Resultados microbiológicos de los equipos</b> .....	89
<b>6.9.4.1. Resultados microbiológicos de la envasadora de gotas</b> .....	89



6.9.4.2. Resultados microbiológicos de la envasadora de jarabes.....	91
6.9.4.3. Resultados microbiológicos de la dosificadora de cremas, mezclador de polvos y encapsuladora de cápsulas.....	91
<b>6.9.5. Resultados microbiológicos de la evaluación de los utensilios.....</b>	<b>94</b>
<b>6.9.6. Resultados microbiológicos de la estabilidad de del detergente y desinfectantes.....</b>	<b>95</b>
<b>7. ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>10. GLOSARIO.....</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo validación de limpieza.....	19
<b>Figura 2.</b> Las tres etapas del modelo de ciclo de vida de la validación basado en La nueva guía de validación de procesos de la FDA .....	21

<b>Figura 3.</b> Composición de los detergentes.....	25
<b>Figura 4.</b> Cuando se emplea FMEA .....	28
<b>Figura 5.</b> El proceso de FMEA.....	29
<b>Figura 6.</b> El proceso de RRF.....	30
<b>Figura 7.</b> Estrategia de trabajo.....	32
<b>Figura 8.</b> kwik-stik de las cepas de referencia ATTC.....	38
<b>Figura 9.</b> Material para la prueba 1.....	44
<b>Figura 10.</b> Material para la prueba 3.....	45
<b>Figura 11.</b> Material para la prueba 4.....	46
<b>Figura 12.</b> Superficies de los equipos evaluadas. Acero inoxidable, espuma, teflón y Plástico.....	49
<b>Figura 13.</b> Técnica de hisopado.....	55
<b>Figura 14.</b> Equipos que se utilizan en la fabricación de los productos seleccionados como peores casos.....	60
<b>Figura 15.</b> Envasadora de Gotas.....	63
<b>Figura 16.</b> Envasadora de Jarabes.....	64
<b>Figura 17.</b> Dosificadora de Cremas.....	64
<b>Figura 18.</b> Equipo Mezclador.....	65
<b>Figura 19.</b> Encapsuladora Capsugel CAP8.....	66
<b>Figura 20.</b> Imagen de los resultados del método de difusión en agar (Kirby –Buaer). <i>Bacillus spezzizinii</i> alcohol al 70% y Glutfar plus al 2% (A y B) <i>B. subtilis</i> alcohol al 70% y Glutfar plus al 2% (C y D).....	68
<b>Figura 21.</b> Valores de los halos de inhibición del detergente LESS al 1% y el desinfectantes Glutfar plus 2%. Método Kirby-Bauer.....	69

<b>Figura 22.</b> Porcentaje de recuperación de los productos en cada una de las superficies evaluadas.....	72
<b>Figura 23.</b> Porcentajes de recuperación de los microorganismos en cada una de las superficies evaluadas.....	74
<b>Figura 24.</b> Placa cromatográfica de las soluciones del principio activo Rutina.....	77
<b>Figura 25.</b> Placa cromatográfica de las aguas de enjuague con el principio activo Rutina.....	78
<b>Figura 26.</b> Curva de conductividad del detergente LESS.....	79
<b>Figura 27.</b> Curva de conductividad del desinfectante Glutfar plus.....	80
<b>Figura 28.</b> Gráfica de los valores de conductividad del desinfectante Alcohol Etílico.....	81
<b>Figura 29.</b> Curva de conductividad de los productos Ajo Capsulas, Azucena Crema y Gualanday Polvo.....	82
<b>Figura 30.</b> Curva de conductividad de los productos Caléndula Jarabe y Valeriana Gotas.....	83
<b>Figura 31.</b> Valores de pH de los 3 lotes pilotos de cada uno de los 5 productos/Equipos.....	86
<b>Figura 32.</b> Valores de conductividad de los 3 lotes pilotos de cada uno de los 5 Productos/Equipos.....	88
<b>Figura 33.</b> Valores de TOC (carbono orgánico total) de los 3 lotes pilotos de cada uno de los 5 Productos/Equipos.....	89
<b>Figura 34.</b> Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la envasadora de gotas en 3 lotes pilotos.....	90
<b>Figura 35.</b> Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la envasadora de jarabes en 3 lotes pilotos.....	91
<b>Figura 36.</b> Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la dosificadora de cremas en 3 lotes pilotos.....	92

**Figura 37.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras del Mezclador de gotas en 3 lotes pilotos.....93

**Figura 38.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la encapsuladora en 3 lotes pilotos.....93

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Clasificación general de antisépticos, desinfectantes y agentes esporicidas .....26

**Pág.**

<b>Tabla 2.</b> Parámetros y efectos establecidos en la FMEA.....	35
<b>Tabla 3.</b> Factor de riesgo (criticidad).....	36
<b>Tabla 4.</b> Grado de riesgo (severidad asociada a cada factor de riesgo).....	36
<b>Tabla 5.</b> Criterios utilizados para la evaluación del riesgo de los equipos.....	37
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de crecimiento de los microorganismos de referencia.....	39
<b>Tabla 7.</b> Crecimientos de bacterias de referencia en medios selectivos y diferenciales.....	39
<b>Tabla 8.</b> Parámetros evaluados en el método de la dilución de uso AOAC 955.15.....	43
<b>Tabla 9.</b> Interpretación de resultados. “Evaluación de superficie”.....	47
<b>Tabla 10.</b> Microorganismos y parámetros utilizados en los ensayos del porcentaje de recuperación.....	49
<b>Tabla 11.</b> Límite microbiológico establecido según USP 37.....	50
<b>Tabla 12.</b> Parámetros químicos establecidos según USP vigente 37.....	50
<b>Tabla 13.</b> Cronograma de actividades.....	57
<b>Tabla 14.</b> Análisis del riesgo del proceso de limpieza y desinfección general.....	58
<b>Tabla 15.</b> Características de los equipos de la planta de fitoterapéuticos 2016.....	61
<b>Tabla 16.</b> RRF calculado para los equipos.....	62
<b>Tabla 17.</b> Puntos críticos de la envasadora de gotas y su superficie total calculada.....	63
<b>Tabla 18.</b> Puntos críticos de la envasadora de jarabes y su superficie total calculada.....	63
<b>Tabla 19.</b> Puntos críticos de la dosificadora de cremas y su	

superficie total calculada.....	64
<b>Tabla 20.</b> Puntos críticos del mezclador y su superficie total calculada.....	65
<b>Tabla 21.</b> Puntos críticos de la encapsuladora y su superficie total calculada.....	65
<b>Tabla 22.</b> Coeficiente fenólico del alcohol etílico desafiado con diferentes microorganismos.....	67
<b>Tabla 23.</b> Porcentajes de crecimiento de mohos y levaduras Método de la dilución de uso AOAC 955.15.....	71
<b>Tabla 24.</b> Límites aceptables de los residuos de productos, del detergente y desinfectantes.....	76
<b>Tabla 25.</b> Recuentos Microbiológicos de los utensilios en 3 diferentes lotes pilotos cada uno.....	94
<b>Tabla 26.</b> Recuentos microbiológicos del detergente y los desinfectantes.....	95

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Matriz de selección de productos.....	109
<b>ANEXO 2.</b> Identificación de género y especie de la cepa nativa aislada.....	112

<b>ANEXO 3.</b> Factor asignado para cada una de las características evaluadas en los equipos. ....	114
<b>ANEXO 4.</b> Procedimientos de limpieza y desinfección diseñados para los 5 equipos.....	115
<b>ANEXO 5.</b> Resultados del tratamiento estadístico de los valores de pH conductividad, TOC y recuentos microbiológicos.....	119

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, los organismos reguladores de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), han aumentado las exigencias para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos y como prioridad se están enfocando en gran medida, en los programas de limpieza, en especial con la validación de los procedimientos de limpieza y desinfección de equipos de las plantas de producción debido a los riesgos asociados con la contaminación cruzada que puede darse entre diferentes productos farmacéuticos.

No existe una metodología general para llevar a cabo la limpieza de un determinado equipo, ni normativas generales que establezcan los límites mínimos permisibles de residuos, esto dependerá de los límites establecidos en los programas de validación de cada industria, por lo que es de vital importancia no solo un buen procedimiento de limpieza sino también una adecuada estrategia de validación del proceso.

Durante el proceso de fabricación de medicamentos, gran cantidad de materias primas e ingredientes activos están expuestos a ser contaminados por otros materiales, agentes de limpieza, microorganismos, partículas presentes en el aire, sustancias intermediarias o en el peor caso por los operarios. A nivel de la industria existen equipos especializados (dedicados) y polivalentes (no dedicados), en este último grupo se debe asegurar una limpieza radical. Es por ello que es necesario asegurar que los procedimientos de limpieza se realizan de forma eficiente.

El proceso de validación implica la verificación de un determinado proceso de limpieza, de manera que este quede absolutamente definido en cuanto a los parámetros críticos del mismo. A causa de los estudios que implica, la validación de la limpieza lleva a una mejor comprensión del proceso, que a su vez permite un mejor control y, como consecuencia, mayor reproducibilidad y eficiencia. Previo a ejecutar la validación se debe tener en cuenta que todos los procedimientos involucrados estén por escrito, el método analítico debe estar validado, se debe realizar una matriz de riesgo para seleccionar el peor caso, el personal debe estar capacitado, los equipos calificados y se deben determinar los criterios de aceptación.



La correcta realización de la validación de limpieza y desinfección depende, en gran parte, de la adecuada definición y selección de: parámetros fisicoquímicos, posibles contaminantes a monitorear para demostrar la efectividad del procedimiento de limpieza, tipo de detergente, contaminación microbiológica, humedad, contaminantes físicos ajenos al producto, entre otros; además de procedimientos de muestreo para detección de contaminación microbiológica, métodos analíticos, límites de aceptación y selección del peor caso (según toxicidad, solubilidad en agua etc.) (Aulton, 2004).

El proceso de validación de limpieza y desinfección se realizó en la planta de producción de fitoterapéuticos del laboratorio de farmacología vegetal LABFARVE certificado en BPM por el INVIMA en el año 2012 y consistió en validar los procedimientos de limpieza y desinfección para equipos de producción de las líneas farmacéuticas de productos líquidos, sólidos y semisólidos.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Validar los procesos de limpieza y desinfección de los equipos críticos involucrados en la fabricación de los productos seleccionados como peor caso en cada una de las líneas de producción de la planta de fitoterapéuticos del laboratorio LABFARVE.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Mediante el análisis del Risk Ranking and Filtering (RRF), establecer los equipos críticos utilizados en los procesos de fabricación de los productos azucena crema, valeriana gotas, caléndula jarabe, ajo desodorizado cápsulas y gualanday polvo.

Determinar los límites aceptables para los residuos de desinfectantes y trazas del principio activo de los productos, mediante el límite basado en la dosis del residuo y para los límites microbiológicos según lo establecido en la USP vigente.

Evaluar y estandarizar los procedimientos de limpieza y desinfección vigentes para cada uno de los equipos seleccionados en la matriz del peor caso.

Demostrar la efectividad del proceso de limpieza y desinfección de equipos durante la fabricación de tres lotes pilotos para cada uno de los productos seleccionados.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Considerando que uno de los aspectos incluidos en las BPM consiste en garantizar la correcta limpieza de los equipos utilizados en la elaboración de productos farmacéuticos y que la preferencia de determinada empresa en el mercado está dada por la calidad de sus productos, es necesario desarrollar y evaluar procedimientos eficientes de limpieza y desinfección para los equipos implicados en los procesos de fabricación, los cuales deben asegurar la reducción de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos a límites que no representen un riesgo para el consumidor final.

Todo procedimiento de limpieza debe ser validado, por ende la validación de limpieza constituye un elemento de suma importancia en la producción de medicamentos, siendo parte esencial de la garantía y calidad de manufactura del producto farmacéutico (Leblanc, 2000).

En el laboratorio LABFARVE se utilizan equipos polivalentes, es decir no dedicados, para la fabricación de diferentes medicamentos en las líneas de líquidos, semisólidos y sólidos, por ende se hace necesario el desarrollo de un procedimiento de limpieza radical de cada uno de los equipos, ya que el uso no dedicado incrementa el riesgo de contaminación física, química y microbiológica. Asimismo, desarrollar la validación del proceso de limpieza y desinfección de los equipos es de vital importancia, debido a que mediante esta actividad, se establecerán los procedimientos de limpieza y desinfección para los equipos del peor caso buscando asegurar la mejora continua en el procedimiento, además la validación es una herramienta que permite la mejora de los procesos de limpieza, el aumento de la productividad y una excelente oportunidad de capacitación para los recursos humanos de los diferentes sectores.

### **3. MARCO REFERENCIAL**

#### **3.1. BASES LEGALES**

-RESOLUCIÓN NÚMERO 3028 DE 2008 (13 de Agosto): Por la cual se definen las áreas técnicas de producción de los establecimientos farmacéuticos y se establecen otras disposiciones. 2008

-GUIDE TO INSPECTIONS VALIDATION OF CLEANING PROCESSES. 1993

-GUÍA DE NORMAS DE CORRECTA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS DE USO HUMANO Y VETERINARIO. Agencia Española de medicamentos y Productos Sanitarios. AEMPS. 2010

-FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, USP 37 2014. Volumen 1. (1225) VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS FARMACOPEICOS.

-VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE LIMPIEZA. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. AEFI. (sección catalana). 1994

-BUENAS PRÁCTICAS DE LA OMS PARA LABORATORIOS DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS. GUÍA DE AUTOEVALUACIÓN DE BPL. Technical Report Series, No. 957, 44th Report. Annex 1. 2010

-COMITÉ EXPERTOS DE LA OMS EN ESPECIFICACIONES FARMACÉUTICAS. Serie de informes Técnicos. 32 Informe 1992.

#### **3.2. ANTECEDENTES**

La limpieza de equipos ha sido fundamental en los requerimientos de las buenas prácticas de producción, aunque esta fue popular hasta finales de la década de los 80 (López y Pierre, 2005). Debido al auge continuo de industrias multipropósito, se incrementó el riesgo potencial de contaminación cruzada y/o alteración de drogas producidas subsecuentemente en un mismo equipo. En la acción de

minimizar estos riesgos de contaminación la FDA se enfatizó en la limpieza de equipos (Zelle, 1993). En julio de 1993 apareció en la guía de la inspección de la FDA una revisión sobre la validación de limpieza. En esta se exigió que las industrias tuvieran por escrito el procedimiento general del proceso de limpieza que sería validado con el respectivo procedimiento de muestreo y el método analítico. En la actualidad las autoridades sanitarias de cada país basándose en la Guía de inspección y procesos de validación de limpieza de la FDA, han establecido reglamentos y normativas orientadas a la implementación del aseguramiento de la calidad de la industria farmacéutica para lograr que sus productos obtengan la calidad requerida internacionalmente (López Y Pierre, 2005).

Jenkins y Vanderwielen (1994) presentaron por primera vez una visión general de la validación de la limpieza, que abarcaba la estrategia, la determinación de límites de residuos, métodos de muestreo y análisis. El mayor uso de equipos multiuso, había aumentado la necesidad en la validación de limpieza

En noviembre de 1994 la asociación española de farmacéuticos de la industria emitió una guía de validación de métodos de limpieza (BARANGÉ *et. al*, 1994) en la cual dio a conocer ciertos lineamientos a tener en cuenta al momento de llevar acabo la validación de la limpieza.

Realmente no existen muchas guías específicas oficiales, apareciendo la validación de la limpieza en las normas oficiales como un punto o dentro del apartado de validación. Por ejemplo en la guía ICH Q7 (ICH Q7, 2000), en la guía de Correcta Fabricación de la UE (Eudralex vol4, Capítulo 3,5 y anexo 15 de validación) (NCF, 2015), o en la organización Mundial de Sanidad (OWS, 2010).

El 20 de noviembre de 2014, la Agencia Europea de medicamentos EMA ha aprobado una nueva guía: Fijación del límite de exposición para análisis de riesgos en instalaciones multiproducto (EMA, 2014), Es la primera guía que define las pautas a seguir para definir el límite de exposición diaria (PDE) en residuos activos basados en los datos toxicológicos, farmacológicos para evaluar la compatibilidad de productos en instalaciones compartida y definir el riesgo de contaminación cruzada.

### **3.3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.3.1. Validación y tipos de Validación**

La validación es una prueba o demostración de que algo hace lo que debe o lo que estaba previsto (Carlberg, 1995). Existen actualmente tres tipos principales de validación: La validación prospectiva se aplica antes de la comercialización de un producto nuevo, o producto elaborado bajo un proceso de fabricación validado, es decir, antes de una fabricación industrial convencional. La validación concurrente es la forma de validación que se lleva a cabo durante la producción normal (CECMED, 1994). La validación retrospectiva o reiterada (revalidación) consiste en establecer una evidencia documentada de la idoneidad de un producto o proceso basándose en la evaluación de los datos históricos acumulados existentes (Caro, 1996).

La validación de los procesos y procedimientos de limpieza de equipos, utensilios y áreas además de constituir un requerimiento regulatorio en la industria farmacéutica, constituye una buena práctica que evidencia la efectividad de los mismos. La industria viene trabajando en la reducción de riesgos relativos a la contaminación y específicamente a la contaminación cruzada. La validación de limpieza ha ido pasando del plano teórico a la práctica de la mejora continua. Como todo proceso la limpieza responde a un ciclo:



### **Figura 1. Ciclo Validación de Limpieza (INVIMA, 2016)**

Normalmente, la validación de los métodos de limpieza se orienta hacia las situaciones o etapas del proceso donde la contaminación o arrastre de materiales pueda suponer el mayor riesgo para la calidad del producto. Si se fabrican distintas sustancias activas o intermedios con el mismo equipo, y el equipo se limpia por el mismo proceso, se puede utilizar un intermedio o sustancia activa representativa para la validación de la limpieza. La elección debe basarse en la solubilidad y dificultad de la limpieza, y en el cálculo de los límites de residuos basados en la potencia, toxicidad y estabilidad. Deberán utilizarse métodos analíticos validados que tengan la sensibilidad adecuada para detectar residuos o contaminantes. El límite de detección de cada método debe ser suficientemente sensible como para detectar los límites de aceptación establecidos de residuo o contaminante. Los estudios de limpieza/desinfección de equipos deben contemplar la contaminación microbiológica y por endotoxinas, para aquellos procesos en los que sea necesario reducir el recuento microbiológico total o de endotoxinas de la sustancia activa o en aquellos otros procesos donde este tipo de contaminación puede resultar negativa. Además de las metodologías analíticas, el examen visual permite la detección de una gran contaminación concentrada en un área pequeña que podría pasar inadvertida en el muestreo y/o análisis (AEMPS, 2010).

Las operaciones de calificación y validación, no deben ser consideradas como ejercicios que se realizan una única vez. Debe existir un programa continuo luego de la implementación inicial, el cual debe estar basado en una revisión anual (GMP, 2010)

La Guía de normas de correcta fabricación de medicamentos de uso humano y veterinario establece que un problema común asociado con el uso de detergente es su composición, por ende se debe determinar la eficiencia del proceso de limpieza para la eliminación de residuos (AEMPS, 2010). Debe existir iluminación adecuada en todas las áreas para facilitar la limpieza, mantenimiento y operaciones adecuados. Se deben establecer programas y procedimientos para el mantenimiento preventivo de los equipos, incluyendo la asignación de responsabilidades. Se deben establecer procedimientos escritos para la limpieza de equipos, y su posterior aprobación para su utilización en la fabricación de intermedios o sustancias activas. Los procedimientos de limpieza deben ser suficientemente detallados para permitir a los operarios limpiar cada tipo de equipo de una manera reproducible y efectiva. Los equipos no dedicados deben limpiarse

entre la fabricación de diferentes productos para evitar contaminación cruzada. Se definirán y justificarán los criterios de aceptación para los residuos y la selección de métodos y agentes de limpieza.

La guía de la FDA para la validación de procesos creó un cambio sistémico en las estrategias de la industria para los programas de validación. En la Figura 2 se describe el esquema de las tres etapas para la validación.



**Figura 2.** Etapas del modelo de ciclo de vida de la validación basado en La nueva guía de validación de procesos de la FDA (FDA, 2001).

### 3.3. 2. Riesgo microbiológico en la industria Farmacéutica

La contaminación microbiana de los productos farmacéuticos y cosméticos ha sido extensamente estudiada tanto a nivel nacional como internacional. Los productos para administración parenteral y de uso ocular deben ser estériles. Existen otras formas farmacéuticas no obligatoriamente estériles que se usan por vía oral, tópica, nasal, vaginal, etc., fabricadas con ingredientes que pueden ser substratos adecuados para los microorganismos. Las preparaciones farmacéuticas y los cosméticos pueden contaminarse con mohos filamentosos, levaduras y bacterias. Las materias primas naturales, el equipamiento, el agua, los operadores, el aire, y el material de empaque pueden ser fuentes de contaminación de los productos farmacéuticos y cosméticos (Bomblies y Beckmann 2007). La FDA reconoce tres categorías de microorganismos: patógenos, oportunistas y objetables: Patógenos



son aquellos microorganismos o toxinas responsables de enfermar o infectar al hombre (***Salmonella*** spp., ***Escherichia coli***, ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Staphylococcus aureus***, ***Candida albicans***, ***Clostridium*** spp., etc). Se consideran oportunistas a aquellos microorganismos que producen enfermedad en pacientes inmunocomprometidos. Y son objetables aquellos microorganismos que pueden inactivar drogas y/o deteriorar el producto provocando una posible falta de eficacia de los productos farmacéuticos y seguridad en cosméticos. Un medicamento o un cosmético se consideran contaminados si contiene microorganismos patogénicos, oportunistas, objetables o metabolitos microbianos tóxicos, o si presentan deterioro físico o químico (Cerra *et al.*, 2013).

La presencia del género ***Staphylococcus*** y particularmente ***S. aureus*** en una materia prima o producto farmacéutico o cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana, es decir los operadores. Estos microorganismos pueden ser transportados por el polvo, piel, ropa y microgotas de humedad que se generan al moverse, hablar y estornudar (PDA, 2007).

La patogenicidad de ***Pseudomonas aeruginosa*** se explica por su gran variedad de factores de virulencia (Holder, 1993). ***Pseudomonas aeruginosa*** y otras bacterias Gram negativas pueden colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de biofilms. Estas estructuras una vez formadas son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes. ***Escherichia coli*** es parte de la flora normal fecal de humanos y animales inferiores, sin embargo, algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario y de heridas (Cerra *et al.*, 2013). Su presencia en un producto de uso o consumo humano implicaría una posible presencia de contaminación fecal en especial en productos de consumo oral y en materias primas de origen natural. ***Salmonella*** spp., es un miembro de la familia ***Enterobacteriaceae*** que puede causar muchos tipos de infecciones desde una gastroenteritis autolimitante hasta afecciones generalizadas como la fiebre tifoidea y paratifoidea. Dada la etiología de este microorganismo es de fundamental importancia su investigación en materias primas de origen natural. Muchos hongos saprófitos, mohos y levaduras ambientales suelen estar ligados a contaminaciones de medicamentos y cosméticos. Los mohos patógenos aislados con más frecuencia son cepas de ***Aspergillus*** spp. y ***Candida*** spp. Los productos más susceptibles a la contaminación fúngica son las soluciones oftálmicas, ungüentos, supositorios, pomadas y en cosméticos, jabones y talcos, y otros que contienen nutrientes ricos en hidratos de carbono y ácidos grasos. Los excipientes y

materias primas derivados de cereales, son también óptimos sustratos para el desarrollo de cepas de **A. flavus**, productores de aflatoxinas. Las hierbas medicinales y medicamentos fitoterápicos pueden ser vehículos también de estos microorganismos (Cerra *et al.*, 2013).

Con el fin de obtener productos con una calidad higiénica aceptable, con niveles bajos de microorganismos indicadores y ausencia de microorganismos patógenos, es imprescindible el control microbiológico de todas las materias primas y del agua usada para fabricación y como ingrediente también debe ser controlada. La correcta limpieza de áreas y equipos, las buenas prácticas higiénicas del personal, un diseño correcto de la formulación y del proceso de fabricación minimizan el riesgo de contaminación microbiana.

### **3.3.3 Tipos de limpieza**

#### **3.3.3 .1 Tipos de limpieza según la frecuencia de lavado**

Existen diferentes tipos de métodos de limpieza según la frecuencia de lavado, los cuales son: el método de limpieza radical o no serial: que elimina residuos de forma exhaustiva y se deben validar de forma completa. Los métodos de limpieza ordinarios, seriales o parciales: utilizados típicamente tras la fabricación consecutiva de lotes del mismo producto no se validan o son objeto de una validación reducida y los métodos de limpieza de repaso o tras inactividad (periodo superior al periodo de validez) y se realiza la validación reducida centrada en el control microbiológico. En este caso al ser equipos polivalentes, que son equipos de uso general, no específico a un determinado producto. El producto fabricado sucesivamente en el mismo equipo cada vez es diferente, lo que implica el uso de procesos de limpieza radical para evitar todo riesgo de contaminación cruzada (Bailly, 2004).

#### **3.3.3.2 Tipos de limpiezas de los equipos industriales**

Actualmente hay tendencia a reducir al mínimo la intervención humana durante la limpieza para superar la falta de reproducibilidad de la limpieza manual. En la

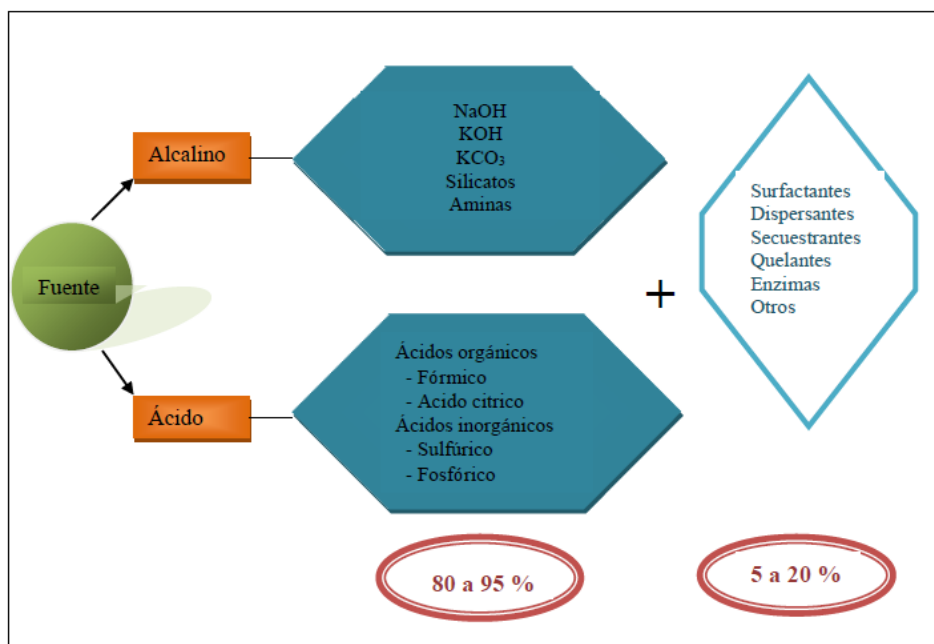
industria farmacéutica se utilizan tres tipos principales de limpieza: manual, semiautomática o totalmente automática (Cumplido, 2014) contando cada uno con sus ventajas y desventajas.

La limpieza manual: se define como la aplicación de una acción mecánica por parte de un operario que usa herramientas y productos de limpieza para limpiar una superficie o equipo. En la limpieza semiautomática: se incluyen operaciones tanto manuales como automáticas y en la limpieza automática no se requiere la intervención humana, ya que está totalmente automatizada. Muy a menudo este tipo de limpieza no requiere un previo desmontaje de los equipos; dentro de las cuales están la CIP (*clean in place*) que es un sistema de limpieza “*in situ*” que utiliza soluciones químicas de limpieza recirculadas por bombas de alta presión y la COP (*clean out of place*) que puede ser automático o semiautomático y que consiste en sacar los elementos de un equipo y llevarlos a cuartos de lavado en donde un tanque lleva a cabo la limpieza de estas partes por ciclos, utilizando diferentes agentes de limpieza (detergentes y desinfectantes) a presión y a una temperatura determinada (Cuben, 2012).

En las operaciones de limpieza, el resultado final depende de cuatro factores interrelacionados como lo son la acción mecánica, acción química, temperatura del agua y tiempo de acción o de contacto. Si uno de los factores se reduce, se debe compensar mediante el aumento de uno o más de los otros (Anaisreig,2011).

### **3.3.4 Detergentes y Desinfectantes**

Los detergentes son combinaciones de compuestos químicos que pueden eliminar la suciedad, de forma general se clasifican como detergentes alcalinos, ácidos y neutros. Los detergentes alcalinos (pH superior a 7,0) actúan mediante la solubilización y desagregación de la suciedad y los detergentes ácidos (pH inferior a 7,0) (Ver figura 3) son utilizados para eliminar sales alcalinas, alcaloides, azúcares y sales calcáreas (Kim, 2006).



**Figura 3.** Composición de los detergentes (Kluger *et. al*, 1981)

Los desinfectantes no son propiamente agentes de limpieza sino de sanitización (limpieza microbiológica) son agente físicos o químicos que al aplicarse sobre una superficie destruyen o eliminan formas vegetativas de microorganismos nocivos. Se aplican sobre superficies que previamente han sido limpiadas con el objeto de mantenerse libres de microorganismos indeseables. Se recomienda alternarlos para evitar el desarrollo de resistencias bacterianas, cambiando por otro desinfectante con mecanismo de acción diferente (AEFI 1994).

Los desinfectantes químicos se clasifican según su composición química, en; aldehídos, alcoholes, halógenos, peróxidos, compuestos de amonio cuaternario y compuestos fenólicos. La eficacia de un desinfectante depende de su actividad biocida intrínseca (Ver tabla 1), la concentración del desinfectante, el tiempo de contacto, la naturaleza de la superficie desinfectada, la dureza del agua usada para diluir el desinfectante, la cantidad de material orgánico presente en la superficie, y el tipo y cantidad de microorganismos presentes.

**Tabla 1.** Clasificación general de antisépticos, desinfectantes y agentes esporicidas.

Entidad Química	Clasificación	Ejemplo
Aldehídos	Agente esporicida	Glutaraldehído al 2%
Alcoholes	Desinfectante de uso general, antiséptico y agente antiviral	Alcohol isopropílico al 70%, alcohol al 70%
Cloro e hipoclorito de sodio	Agente esporicida	Hipoclorito de sodio al 0,5%
Fenólicos	Desinfectante de uso general	500 µg por g de Clorocresol, 500 µg por g de cloroxileno
Ozono	Agente esporicida	8% de Gas en peso
Peróxido de hidrógeno	Esterilizante de fase vapor, agente esporicida líquido, antiséptico	4 µg por g de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vapor, solución del 10% al 25%, solución al 3%
Biguanidas sustituidas	Agente antiséptico	Gluconato de clorhexidina al 0,5%
Ácido peracético	Esterilizante líquido, esterilizante de fase vapor	Ácido peracético al 0,2%, 1 µg por g de ácido peracético
Óxido de etileno	Esterilizante de fase vapor	600 µg por g de Óxido de etileno
Compuestos de amonio cuaternario	Desinfectante de uso general y antiséptico	Concentración dependiente de la aplicación, Cloruro de benzalconio
β-Propiolactona	Agente esporicida	100 µg por g de β-Propiolactona

Fuente: (USP, 2014)

### 3.3.5. Clean Hold Time y Dirty Hold Time (Tiempo de permanencia de un equipo en estado limpio y Tiempo de permanencia del equipo en estado sucio)

El tiempo de permanencia del equipo en estado limpio es el tiempo transcurrido entre la finalización de la limpieza del equipo y su uso en una nueva operación de fabricación (**Clean Hold Time –CHT-**). Esto es para evaluar la efectividad del procedimiento de limpieza sobre la parte del equipo limpio, seco y bien almacenado. Si el equipo se coloca en la sala para guardar equipos antes de completar su proceso de secado o si el equipo se guarda de forma inapropiada, podría desarrollarse contaminación microbiológica inaceptable (Cgmpblog, 2012).

El tiempo de permanencia del equipo en estado sucio (**Dirty Hold Time -DHT-**) se define como el tiempo transcurrido entre la finalización del proceso de fabricación en un equipo y el inicio del proceso de limpieza. Este tiempo puede permitir que

los residuos se sequen y se hagan más difíciles de eliminar. Esta demora de tiempo puede crear un gran desafío para los procedimientos de limpieza (Forsyth, 2008).

La eliminación de la suciedad en el equipo se vuelve difícil cuando el DHT aumenta, y para el equipo una vez limpio la posibilidad de que se ensucie aumenta cuando aumenta el CHT (FUGATE, 2007).

### **3.3.6 Métodos analíticos y de muestreo en la validación**

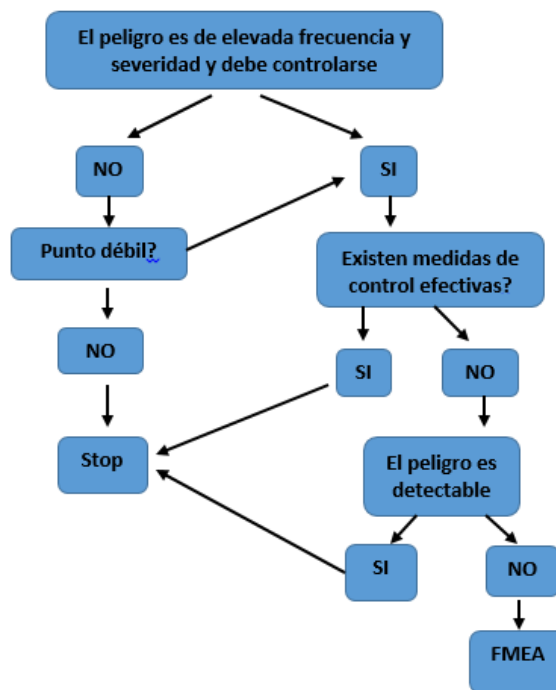
La FDA recomienda el uso de métodos específicos en lugar de pruebas no específicas durante la validación de limpieza, pero acepta métodos no específicos si se justifica adecuadamente su uso (Bailly, 2004). Los métodos específicos son capaces de detectar cada ingrediente del producto analizado diferenciándolo de otros productos, incluso semejantes desde el punto de vista químico, algunos ejemplos son: la cromatografía líquida de alta resolución, absorción atómica, cromatografía de capa delgada, entre otras; se debe seleccionar la técnica más sensible y específica para verificar las bajas concentraciones de residuos después de un proceso de limpieza. Los métodos no específicos son métodos generales o de amplio espectro que detectan cualquier compuesto que produce una determinada respuesta, algunos ejemplos son: carbono orgánico total (*TOC*), pH, conductividad. Los métodos más aconsejables para la validación de la limpieza son: *TOC* para las sustancias orgánicas y conductividad para las sustancias iónicas (Rezquellah, 2015).

Para la validación de los procesos de limpieza y desinfección se emplean actualmente tres métodos de muestreo: el muestreo de superficie directa o hisopado, el muestreo por enjuague y el muestreo placebo; el más empleado es el método directo de muestreo de la superficie del equipo. El muestreo de superficie directa permite definir el tipo de material y su impacto en los datos de la prueba. Por lo tanto, al principio del programa de validación, es importante asegurar que el método de muestreo y el disolvente (utilizado para la extracción del medio) no interfieren en los resultados y se pueden utilizar fácilmente. Dentro de las ventajas de emplear esta técnica se encuentra que disuelve y recupera la muestra de manera física y directa, es adaptable a varios tipos de superficie, económica, accesible y permite muestrear una superficie determinada y cuantificable (FDA, 1993).

### 3.3.7 Análisis del riesgo

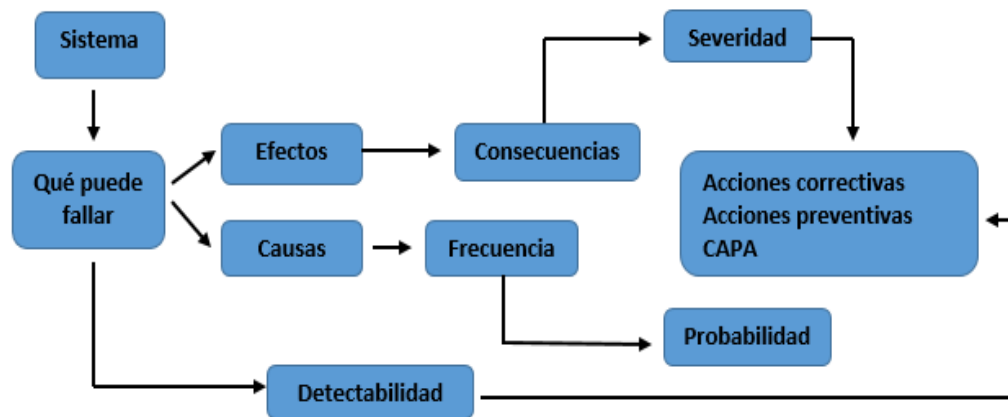
En la industria farmacéutica, la calidad del producto debe ser considerada durante todo el ciclo de vida: desde el desarrollo del medicamento hasta su venta. Actualmente la ICH Q9 está incluida dentro del anexo 20 de las NCF por lo que es de obligado cumplimiento. El análisis de riesgo resulta una técnica muy útil y coherente para aplicar a la validación de limpieza ya que ayuda a organizar y planificar la validación desde un punto de vista racional (White y Moallah, 2005).

La herramienta *Failure Mode and Effects Analysis* (FMEA) es un procedimiento que se puede aplicar para identificar los peligros y su probabilidad de ocurrencia. Se trata de una herramienta de prevención, para identificar todos los fallos potenciales de un producto, proceso o sistema antes de utilizarlos, así como la evaluación de los efectos o consecuencias de los modos de fallo identificados (STAMATIS, 1995). Es una metodología basada en el conocimiento del producto y/o proceso que permite la gestión de procesos complejos dividiéndolos en pasos sencillos. En la figura 4 se esquematiza cuando se recomienda usar la técnica FMEA y en la figura 5 su sistema de aplicación.



**Figura 4.** Cuando se emplea FMEA (Tazón, 2007)

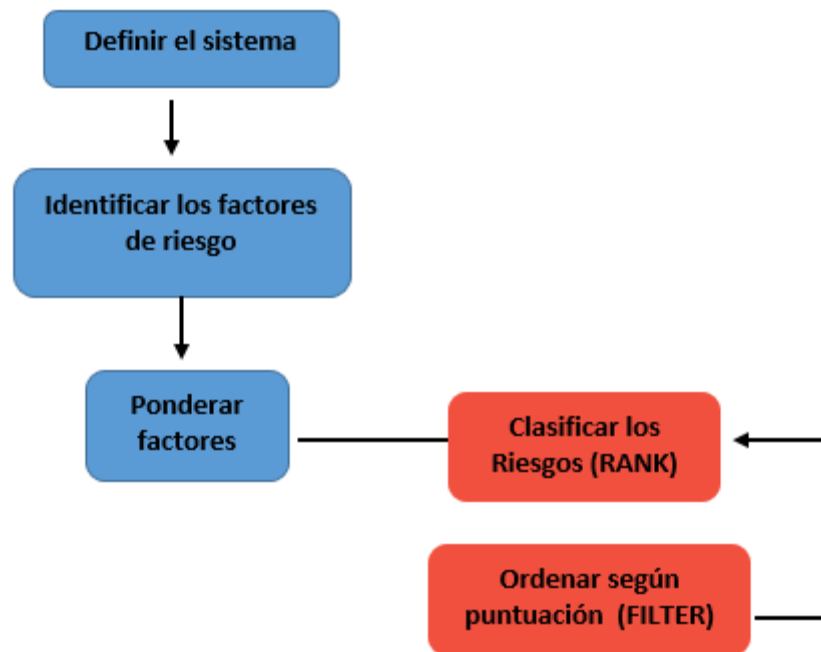
Para aplicarlo se divide el proceso en las partes independientes y después se analiza cada una frente a 3 parámetros: Severidad o gravedad, detectabilidad y probabilidad (Salazar *et al.*, 2007).



**Figura 5.** El proceso de FMEA (Tazón, 2007)

Por otro lado, la herramienta *Risk Ranking and Filtering* (RRF) es una metodología que permite priorizar el riesgo y obtener el listado de riesgos ordenados según su criticidad. Con el resultado se podrá valorar los posibles riesgos a reducir. Se utiliza en sistemas con diversos tipos de riesgo, muchas variables y con consecuencias asociadas variadas. En la figura 6 se describen los pasos a seguir para su aplicación.





**Figura 6.** El proceso de RRF (Tazón, 2007)

### 3.3.8 Laboratorio LABFARVE

LABFARVE es un laboratorio de farmacología vegetal que fue fundado por el Doctor Jorge Piñeros Corpas en el año de 1971 como unidad de investigación de la Universidad Juan N. Corpas en Bogotá, actualmente las actividades están relacionadas con el estudio, cultivo, procesamiento, control de calidad, análisis químico, estudios clínicos y toxicológicos de extractos vegetales de la más alta calidad. Las líneas farmacéuticas que se fabrican son fitoterapéuticos, esencias florales, cosméticos y alimentos (LABFARVE, 2016). Cuenta con una planta de producción de fitoterapéuticos certificada con BPM desde el año 2012.

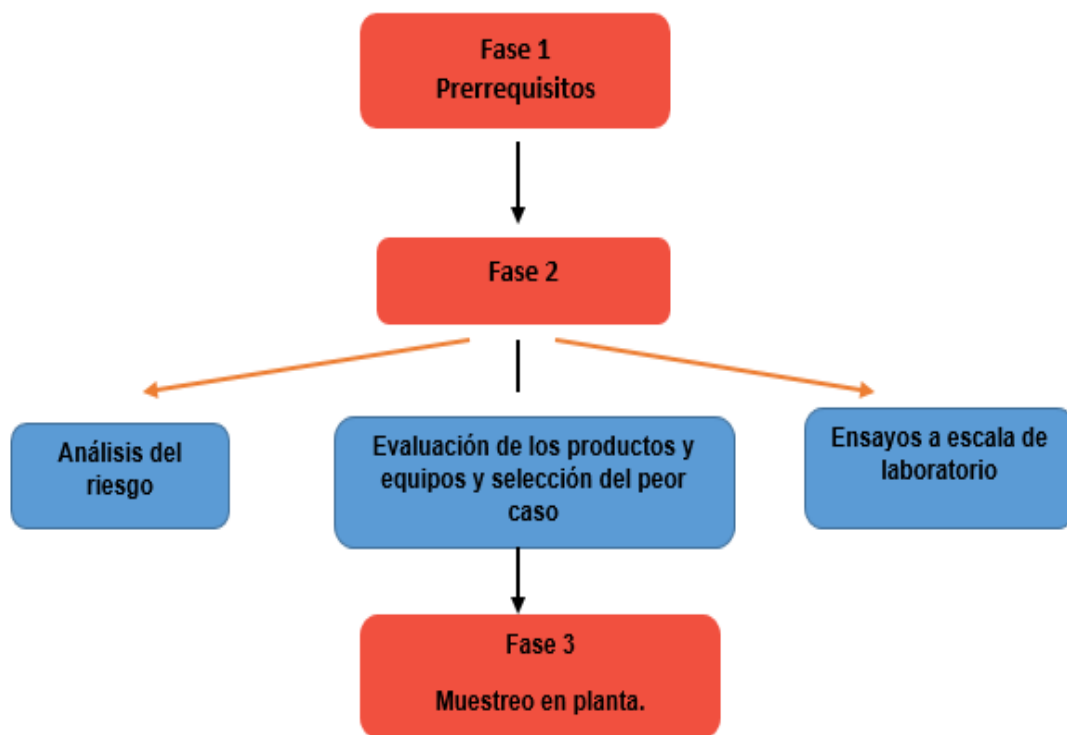
#### 4. METODOLOGÍA

La metodología se desarrolló en 3 fases fundamentales (Ver figura 7), teniendo en cuenta las recomendaciones dadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA, las cuales fueron:

**Fase 1 Prerrequisitos:** En esta fase se verificó que todos los sistemas de apoyo crítico como lo fueron el sistema de aires controlados y el agua de uso farmacéutico entre otros cumplieran con las especificaciones establecidas.

**Fase 2:** En esta fase se desarrollaron 3 actividades las cuales consistieron primero en el análisis de riesgo del proceso de LyD, la segunda actividad fue la evaluación de los productos y equipos y selección del peor caso e y como último paso de esta fase se realizaron los ensayos a escala de laboratorio que consistieron en determinar la eficiencia antimicrobiana del detergente y los desinfectantes seleccionados, se establecieron los límites permitidos de residuos, de pH, de conductividad y de TOC.

**Fase 3 Muestreo en planta:** Esta fase consistió en tomar las muestras de cada uno de los equipos seleccionados durante la fabricación de 3 lotes pilotos por cada producto para realizar los análisis microbiológicos y químicos; y de esta manera finalizar con el proceso de validación.



**Figura 7.** Estrategia de trabajo

## **FASE 1**

### **4.1. PRERREQUISITOS**

La validación del procedimiento de limpieza y desinfección (LyD) de equipos de la planta de fitoterapéuticos es un proceso que involucra la participación activa tanto del personal del control de calidad como el de mantenimiento y producción, además del compromiso de la alta dirección. Para realizar la validación se debió cumplir con una serie de prerrequisitos como fueron:

1. La planta de fitoterapéuticos se encuentra distribuida en 12 áreas, de las cuales solo 5 estuvieron involucradas en el proceso de validación y fueron: el área de envasado de líquidos 1, área de envasado de líquidos 2, el área de preparación y envasado de semisólidos, el área de encapsulado y el área de mezclado. Es importante aclarar que estas áreas no son dedicadas, es decir se fabrican diferentes productos.

2. El agua utilizada para los procesos de LyD corresponde a agua de tipo potable y agua purificada, estas aguas cumplen con las especificaciones estipuladas en el capítulo <1231> AGUA PARA USO FARMACÉUTICO de la USP vigente lo cual asegura su calidad.
3. Los sistemas de apoyo crítico, es decir, el agua y el aire, se encuentran validados en la actualidad. Las áreas de fabricación cuentan con un sistema de suministro de aire filtrado (filtros HEPA), un sistema de extracción de aire y un sistema de aire comprimido. Todos los filtros del sistema son cambiados periódicamente, lo que asegura la calidad microbiológica del aire.
4. El análisis microbiológico de ambientes y superficies de la planta de fitoterapéuticos se lleva a cabo desde años anteriores, teniendo en cuenta los límites establecidos en el capítulo <1115> Control Microbiológico y Monitoreo de Ambientes de Procesamiento No Aséptico de la USP vigente. Se realiza 2 veces a la semana, los días martes y jueves. Gracias a este seguimiento microbiológico se cuenta con un historial de la planta, a partir del cual se determinan los límites de alerta y acción.
5. LABFARVE cuenta con un laboratorio de control de calidad que cumple con las especificaciones establecidas en el capítulo <1117> ÓPTIMAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO MICROBIOLÓGICO de la USP Vigente. Las buenas prácticas en un laboratorio microbiológico consisten en actividades que dependen de varios principios: técnicas asépticas, control de medios, control de cepas de prueba, operación y control de equipos, registro detallado y evaluación de datos así como capacitación del personal de laboratorio. Debido al riesgo inherente de variabilidad de los datos microbiológicos, la confiabilidad y la reproducibilidad dependen de la utilización de los métodos aceptados y del cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.
6. Dentro del proceso de validación se debió incluir un microorganismo propio de la planta. En este caso el monitoreo microbiológico de ambientes y superficies de las diferentes áreas de la planta de fitoterapéuticos que se realizó en años anteriores, permitió el aislamiento de una cepa nativa

habitual de este campo. Dicha cepa fue identificada siguiendo el procedimiento estipulado en el capítulo <1113> CARACTERIZACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS de la USP Vigente.

7. Se observó en campo la ejecución de cada uno de los procedimientos de limpieza y desinfección de equipos de la planta de fitoterapéuticos estandarizados en los POES versión 2012 y 2013.
8. Antes de diseñar un protocolo de validación, se aseguró que cada uno de los equipos involucrados en el proceso de fabricación estuvieran incluidos dentro de un sistema de aseguramiento metrológico y mantenimiento preventivo a la fecha.

## **FASE 2**

### **4.2 ANÁLISIS DEL RIESGO, EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS Y EQUIPOS Y SELECCIÓN DEL PEOR CASO Y ENSAYOS A ESCALA DE LABORATORIO.**

Posteriormente se diseñó una matriz del peor caso para productos, teniendo en cuenta parámetros como frecuencia, solubilidad, toxicidad, y la facilidad de limpieza y se seleccionaron los productos considerados complejos (Ver Anexo 1).

#### **4.2.1 Failure Mode and Effects Analysis (FMEA)**

Mediante la herramienta de prevención FMEA se realizó un análisis de riesgo detallado de cada una de las fases del proceso de limpieza y desinfección para determinar las posibles fallas potenciales del proceso, así como la evaluación de los efectos o consecuencias de los modos de fallos identificados.

Para aplicarla se dividió el proceso en las partes independientes y después se analizó cada una frente a 3 parámetros: severidad o gravedad, detectabilidad y probabilidad (Ver tabla 2)

Para cada uno se valoró si el efecto de no actuar sobre ese factor tendría consecuencias o efectos de alto, medio o bajo grado sobre cada parámetro:

**Tabla 2.** Parámetros y efectos establecidos en la FMEA.

Valores de gravedad	Valores de probabilidad	Valores de dificultad de detección
Alto: si el resultado de no actuar daría un producto que no cumple con las especificaciones	Alto: muy probable que suceda	Alto: el problema no se puede identificar cuando sucede.
Medio: puede tener algún efecto sobre la calidad el producto	Medio: puede suceder en situaciones normales	Medio: el problema puede identificarse cuando sucede
Bajo: no afecta a la calidad del producto, o de forma muy leve	Bajo: muy improbable que suceda.	Bajo: el problema se detecta fácilmente cuando sucede

#### 4.2.2 Evaluación de los equipos y selección de los peores casos

A partir de los productos escogidos como peor caso, se utilizó la herramienta RRF para seleccionar los peores casos de los equipos que son utilizados en los procesos de fabricación de dichos productos. Se aplicó la técnica RRF de gestión de riesgo con base en una serie de factores y grado de riesgo (criticidad) previamente establecidos y cuantificados como son: factor de desmontaje de piezas, factor facilidad de limpieza y factor de puntos de contacto directo con el producto.

#### Las Fases del RRF

1. Identificación del riesgo y establecimiento de grupos de factores de riesgo
2. Ponderación del riesgo, donde dicha valoración depende del autor y en este caso corresponde a:

**Tabla 3.** Factor de riesgo (criticidad)

Factor de riesgo	Ponderación
Muy crítico	3
Moderadamente crítico	2
Poco crítico	1

**Tabla 4.** Grado de riesgo (severidad asociada a cada factor de riesgo)

Factor de riesgo	Ponderación
Muy severo	1,5
Moderadamente severo	0,75
Poco severo	0,25

#### 4.2.3 Criterios para la evaluación de los peores casos de los equipos

- 1. Desmontaje:** se determina en cuantas partes se desmonta el equipo, siendo bajo riesgo entre 0 y 3 piezas, riesgo medio entre 4 y 8 piezas y riesgo alto más de 9 piezas.
- 2. Facilidad de limpieza:** se determina la facilidad de limpieza del equipo, siendo de bajo riesgo la limpieza sencilla, riesgo medio un proceso medianamente complejo y riesgo alto un proceso complejo.
- 3. Punto de contacto:** se determinan cuántas partes del equipo tienen contacto directo con el producto (API), siendo bajo riesgo entre 0 y 3 puntos de contacto, riesgo medio entre 4 y 6 puntos de contacto y riesgo alto más de 6 puntos de contacto.

Para cada parámetro de los mencionados anteriormente, se hace una valoración de la criticidad del parámetro y se aplica la ponderación detallada en la tabla.

**Tabla 5.** Criterios utilizados para la evaluación del riesgo de los equipos.

PARÁMETROS	GRADO DE RIESGO	CARACTERÍSTICAS	FACTOR DE RIESGO
Desmontaje	2	De 9 y más piezas	1,5
		De 4-8 piezas	0,75
		De 0- 3 piezas	0,25
Facilidad de Limpieza	2	Compleja	1,5
		Medianamente compleja	0,75
		no compleja	0,25
Puntos de contacto directo con el API	3	6 y más	1,5
		4-6	0,75
		0-3	0,25

Para el cálculo del RRF se usó la fórmula siguiente:

$$RRF=FD+FL+FCD$$

**Siendo FD:** Factor de desmontaje de piezas

**FL:** Factor facilidad de limpieza

**FCD:** Factor de puntos de contacto directo con el API

#### **4.3. PRUEBA DE CALIFICACIÓN DEL DETERGENTE Y LOS DIFERENTES DESINFECTANTES.**

##### **Microorganismos de prueba**



Los microorganismos empleados en cada una de las técnicas corresponden a cultivos liofilizados reconocidos por las colecciones de la America Type Culture Collection (ATCC).

Los cultivos fueron registrados en el formato de registro de control de cepas de referencia F584M20 y almacenados a una temperatura de refrigeración entre 2 – 8 °C.

#### **4.3.1. Procedimiento para el manejo de los microorganismos de referencia KWIK-STIK**

Se prepararon los diferentes medios necesarios asegurando la esterilidad y promoción de los mismos.

Se sacaron las unidades de kwik-stik (Ver figura 8) de cada uno de los microorganismos del lugar de almacenamiento para atemperar sin abrir.

Se desinfectaron las bolsas con alcohol etílico al 70% y se dejó actuar por 5 min.

Se dio apertura a las bolsas y la posterior identificación de la posición de la pastilla y la del fluido hidratante. Se liberó el fluido hidratante por presión facilitando el flujo de este.

Se desintegró el gránulo que poseía el microorganismo y se mezcló con el fluido hidratante.

Se inocularon por siembra masiva 3 cajas de medio TSA (Tripticasa de soya agar) por cada microorganismo y 1 tubo de medio TSB (Tripticasa de sota caldo) para el caso de las bacterias y en lo que corresponde a mohos y levaduras las mismas cantidades pero de medio agar Sabouraud. Las temperaturas de incubación y los tiempos, se establecieron dependiendo las características de cada microorganismo (Ver tabla 6).



**Figura 8.** kwik-stik de las cepas de referencia ATCC.

**Tabla 6.** Condiciones de crecimiento de los microorganismos de referencia.

MICROORGANISMO	MEDIOS DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Salmonella thypimurium</i> ATCC 14028 <i>Bacillus spezzinii</i> ATCC 6633 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Cultivo: Agar tripticasa de soya Caldo tripticasa de soya	30 °C a 35 °C 18 a 24 horas
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Agar sabouraud Caldo tripticasa de soya	20° C a 25 °C 72 horas 20 °C a 25 °C 6- 7 días

Transcurrido el tiempo se observó el crecimiento de cada una de las cajas y tubos para asegurar la pureza, la morfología macroscópica, morfología microscópica.

Para reconfirmar la identidad de los microorganismos se sembraron inóculos en agares selectivos para el caso de bacterias (Ver tabla 7).

**Tabla 7.** Crecimientos de bacterias de referencia en medio selectivos y diferenciales.

MICROORGANISMO	MEDIOS DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Agar VRBA+MUG y EMB	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Salado Manitol	

<b>ATTC 6538</b>		30° C a 35 °C 18 a 24 horas
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027</b>	Agar Cetrimide	
<b><i>Salmonella thypimurium</i> ATCC 14028</b>	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	
<b><i>Bacillus spezzinii</i> ATCC 6633</b>	Agar Mossel	

#### **4.3.2. Procedimiento para la conservación de los microorganismos en Cryobank.**

Se tomaron inóculos concentrados de las cajas frescas de los medios de cultivo no selectivos de cada uno de los microorganismos y se disolvieron en el medio que contenían los tubos de Cryobank.

Se agitaron los tubos hasta incorporar completamente el inóculo al medio, esto permitió que los microorganismos se adhirieran a las perlas. Con pipetas estériles se removió el medio de cultivo sobrante de los tubos, seguidamente se sellaron los criovales y se almacenaron a temperatura de congelación entre -4 °C y -14 °C.

#### **4.3.3 Aislamiento y caracterización de la cepa nativa.**

Para el aislamiento de la cepa nativa se tuvo en cuenta el crecimiento observado en los resultados anteriores de los análisis microbiológicos de las superficies de la planta de producción.

Se tomó un inóculo de esta y sembró por agotamiento y duplicado en medio TSA, las cajas se llevaron a incubación a una temperatura de 35 °C por un periodo de 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó tinción de Gram para determinar su morfología y su clasificación. Posteriormente se realizó una nueva siembra por agotamiento en agar TSA para ser enviada a un laboratorio externo y así determinar el género y especie de dicha cepa nativa.

#### **4.3.4. Determinación de la actividad antimicrobiana del detergente y los desinfectantes.**

Se llevó a cabo la activación de las diferentes cepas, para esto se sacaron los tubos de Cryobank a atemperar y se tomó rápidamente una perla de cada uno de los tubos de los diferentes microorganismos y se inóculo en los medios de cultivo y temperaturas de incubación anteriormente mencionadas en la Tabla 6.

Los tubos de Cryobank con las perlas sobrantes se volvieron a llevar inmediatamente a congelación para prevenir su descongelación. Transcurrido el tiempo se observó el crecimiento de cada una de las cajas y tubos para asegurar la pureza, la morfología macroscópica y morfología microscópica. Se sembraron inóculos de las diferentes bacterias en agares selectivos y diferenciales nuevamente para asegurar la identidad de cada microorganismo.

#### **4.3.5. Método del coeficiente Fenólico USP según la AOAC 955.11**

La metodología descrita a continuación es una modificación del método AOAC 955.11 (Forero y Piedrahita, 2008)

Se utilizaron las soluciones de alcohol etílico al 70% y 90% en un volumen de 5 mL. Las concentraciones de fenol fueron 1/70, 1/90, los ensayos se realizaron para los microorganismos *Escherichia coli*, *Saphylococcus aureus*, *Bacillus spezzinii* y la cepa nativa con el respectivo control positivo y negativo.

Posteriormente se tomaron inóculos de cada uno de los microorganismos de los medios de cultivos TSA no mayores a 24 horas y de medio agar Sabouraud de no más de 72 horas de crecimiento.

Se prepararon suspensiones de cada uno de los microorganismos en agua peptonada buferada estéril teniendo en cuenta una concentración de  $12 \times 10^8$  UFC/mL la cual es equivalente al tubo número 4 de la escala de MacFarland, se evaluaron tiempos de contacto de 5 min y 10 min. La confirmación de la concentración de los diferentes microorganismos se realizó mediante recuento en placa.

A los tubos con las diferentes diluciones del Alcohol y fenol se le adicionó 0.5 ml (500 uL) de los microorganismos de prueba. Una vez fueron adicionados los microorganismos por separado se agitó manualmente.

Terminado los diferentes tiempos de contacto evaluados se inóculo a partir de las soluciones (alcohol etílico + microorganismo) a caldo nutritivo Letheen con la ayuda de una micropipeta, finalizado el procedimiento se llevaron a incubar los tubos a una temperatura de 35 °C y 22 °C respectivamente. Se utilizaron los respectivos controles positivo y negativo.

La lectura de los tubos se realizó cualitativamente por la presencia de turbidez: positivo (crecimiento) o negativo (inhibición del crecimiento), los tubos positivos se identificaron y confirmaron en medios de cultivos selectivos. La metodología se realizó por triplicado para la verificación de resultados.

Obteniéndose los resultados se procedió a calcular el número del coeficiente empleando la siguiente formula:

Ecuación coeficiente fenólico (AOAC, 2000)

$$\text{Coeficiente fenólico: } \frac{> \text{ dil desinfectante que mate en } 10' \text{ pero no en } 5'}{> \text{ dil fenol que mate en } 10' \text{ pero no en } 5'}$$

#### 4.3.6 Método de difusión en agar (Técnica Kirby-Bauer) (AOAC, 2000).

Se tomaron inóculos de cada uno de los microorganismos de medios de cultivos TSA no mayores a 24 horas y de medio agar Sabouraud de no más de 72 horas.

Se prepararon suspensiones de 9 ml de cada uno de los microorganismos en agua peptonada buferada estéril teniendo en cuenta una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL la cual es equivalente al patrón 1 de la escala de MacFarland (Pombo *et al.*, 2016). La confirmación de la concentración de los diferentes microorganismos se realizó mediante recuento en placa.

Para la preparación de las concentraciones del detergente y los desinfectantes se utilizó agua purificada y recipientes estériles.

Los microorganismos desafiados fueron *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus spezzinii*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans* y la Cepa nativa. El detergente y el desinfectante fueron Lauril Éter Sulfato de Sodio 1% y Glutfar plus al 2%.

La siembra de los microorganismos se realizó masivamente y por duplicado en cajas de Petri con agar Muller-Hilton de un grosor de 4 mm empleando hisopos, posteriormente se emplearon discos blancos estériles de 0.25 pulgadas, cada uno de ellos se humedeció con la solución del agente de limpieza correspondiente, seguidamente se colocaron sobre la superficie del agar con la ayuda de pinzas estériles. Esto se realizó por duplicado y con los correspondientes controles negativos (agua destilada estéril) y positivos (Gentamicina). Terminado los montajes se llevaron a incubar a una temperatura de 35 °C por 24 horas bacterias y a 22 °C por 72 horas mohos y levaduras.

#### 4.3.7 Método de la dilución de uso AOAC 955.15

El método a continuación es una modificación del Use Dilution Method de la AOAC 955.15 (Forero y Piedrahita, 2008).

##### 4.3.7.1 Preparación de los cultivos de prueba

Los microorganismos evaluados fueron *Escherichia coli* gram (-), *S. aureus* gram (+) y *Bacillus spezzinii* (Esporulado), Levadura *Candida albicans*, moho *Aspergillus brasiliensis* y la cepa nativa.

Para la preparación del cultivo prueba fueron necesarios: cajas con cultivo estándar TSA y Sabouraud por cada microorganismo. A partir de cada una de las cajas se tomaron inóculos y se prepararon soluciones de microorganismos en agua peptona teniendo en cuenta una concentración de microorganismos de  $3 \times 10^8$  que corresponden al patrón de McFarland 1. Como compuestos interferentes se evaluó Ajo cápsulas y Azucena crema en 10 ppm y 100 ppm cada uno.

Los materiales se asignaron teniendo en cuenta que se realizaron cinco pruebas, en las cuales fueron evaluados los siguientes parámetros:

**Tabla 8.** Parámetros evaluados en el Método de la dilución de uso AOAC 955.15

NÚMERO DE PRUEBA	MICROORGANISMO	MATERIA ORGANICA	ALCOHOL ETILICO AL 70%	SOPORTE	GLUTARALDEHIDO AL 2%
Prueba 1	+	+	+	+	+
Prueba 2	+		+	+	+
Prueba 3	+			+	
Prueba 4		+			
Prueba 5				+	

#### 4.3.7.2 Desarrollo del método

##### Prueba 1

A) Se tomaron 5 ml de la solución de microorganismos por separado y se adicionaron a los 5 ml de las 2 soluciones de materia orgánica de Ajo cápsulas y a las 2 soluciones de Azucena crema 10 ppm y 100 ppm respectivamente, se mezclaron cuidadosamente por separado y se incubaron 1 hora a 35<sup>0</sup> C.

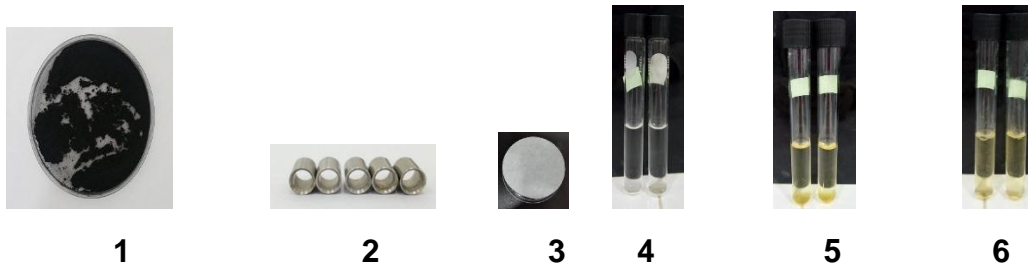
B) Se extrajeron los cilindros estériles del frasco con una pinza estéril y se depositaron con cuidado en la solución de microorganismo y materia orgánica 10 ppm y 100 ppm para formar la solución prueba 2. Se incubaron por 30 min a 35<sup>0</sup> C.

C) Posteriormente el soporte fue extraído, utilizando la pinza, de la solución para ser colocado en una caja de Petri con papel filtro, se incubaron a una temperatura de 35<sup>0</sup> C por 30 min (secado). No más de cinco cilindros por cada caja.

D) Terminado el tiempo de secado se colocaron los soportes durante un periodo de 10 min en las soluciones de Alcohol etílico al 70% y de Glutfar plus 2% por separado.

E) Finalizado el tiempo de contacto, el soporte se adicionó durante 30 min al caldo Letheen para la neutralización de la solución de alcohol etílico.

F) Para una completa confirmación del test el soporte se colocó en caldo TSB después del contacto entre el soporte y el caldo Letheen.



**Figura 9.** Material para la prueba 1.

1 Carbon activado, 2 penicilindros esteriles, 3 cajas de petri con papel filtro esteril, 4 Solución de alcohol al 70 %2 y Glutfas plus al 2% 5 Caldo Letheen y 6 Caldo Tripticasa de Soya.

Se tuvo en cuenta que durante el pase de los cilindros a cada uno de los tubos de medio de cultivo se debe evitar el contacto con las paredes.

### **Prueba 2 (control negativo)**

A) De la solución de microorganismos restantes descrita en el numeral 4.3.7.1 se adicionaron 2.5 ml a 10 tubos estériles por separado.

B) Posteriormente a cada uno de los tubos con microorganismo se le adicionaron 2.5 ml de agua destilada estéril para formar la solución prueba. (2)

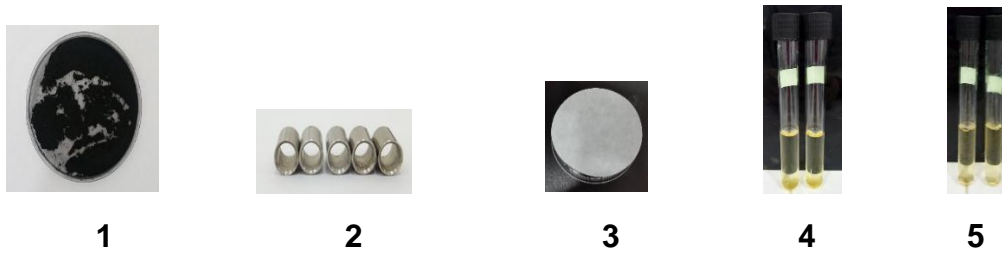
C) Terminado el proceso de preparación de la solución prueba se siguieron los mismos parámetros de la prueba 1.

### **Prueba 3 (viabilidad de los microorganismo prueba)**

A) La solución de prueba consiste en 5 ml de la solución del microorganismo únicamente.

B) Se procedió bajo los mismos parámetros de la prueba 1, teniendo en cuenta que en esta no se emplea la solución de alcohol etílico ni Glutfat plus.





**Figura 10.** Material para la prueba 3.

1. Cilindros estériles, 2. Solución del microorganismo, 3. Caja de petri con papel filtro, 4. Caldo Neutralizante (caldo Letheen) y 4. Caldo TSB.

#### **Prueba 4 (control microbiológico de la materia orgánica)**

C) Se tomó 1 ml de la solución de materia orgánica (1) y se sembró en caldo TSB v (2)

D). Se incubó a 35<sup>0</sup> C durante 24 horas.



**Figura 11.** Material para la prueba 4

1. Solución de materia orgánica y 2. Caldo TSB

#### **Prueba 5 (Control microbiológico de los cultivos)**

Con la ayuda de la pinza estéril se transfirió el soporte a caldo BHI. (Evaluación microbiológica).

## Lectura de resultados

Una vez terminadas las pruebas, se llevaron a incubar los tubos con caldo Letheen y BHI a 35 °C por 48 horas.

Las lecturas se realizaron por la aparición de turbidez en cada uno de los caldos los resultados ( Ver tabla 9) se informaron de la siguiente manera.

**Tabla 9.** Interpretación de resultados. “Evaluación de superficie

NUMERO DE TUBOS	INTERPRETACIÓN
>8	La materia orgánica interfiera en la acción bactericida del desinfectante sobre la superficie
5 a 7 tubos positivos	La actividad del desinfectante se ve afectada, para mayor seguridad repita la prueba o aumentar la concentración de materia orgánica.
< 5 tubos positivos	La materia orgánica no interfiere en la actividad antimicrobiana del desinfectante sobre la superficie.

Se realizó un repique en agar TSA para los tubos positivos (turbios) de las pruebas 1 y 3 para la confirmación de los microorganismos. Se incubó a 35 °C por 48 horas.

Teniendo en cuenta el tipo de microorganismo que se evaluó, se realizaron pases a agares selectivos desde el agar TSA. Para el caso de *E. coli* agar EMB y *S. aureus* agar salado manitol. Las cajas se incubaron a 35 °C por 48 horas.

## 4.4 EVALUACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE LOS EQUIPOS

#### **4.4.1 Ensayos del porcentaje de recuperación en las diferentes superficies de los equipos.**

Los equipos seleccionados como peores casos están fabricados en su gran mayoría en acero inoxidable, aunque también presentan piezas en materiales como espuma, teflón y plástico, por ende se debió evaluar el porcentaje de recobro en cada una de las diferentes superficies. El procedimiento para determinar dicho porcentaje fue el siguiente:

Se tomaron placas de 25 cm<sup>2</sup> limpias de cada una de las superficies anteriormente mencionadas. Se pesaron por separado en una balanza analítica debidamente calibrada. Se adicionaron 600 gr de cada uno de los productos: en el caso del acero inoxidable se ensayó con caléndula jarabe, valeriana gotas, ajo capsulas, crema de azucena y gualanday polvo, para la superficie de espuma solo ajo capsulas, para el teflón valeriana gotas y azucena crema y para el plástico jarabe caléndula, valeriana gotas y crema azucena.

Se llevaron a 35 °C cada una de las superficies durante 20 min. Transcurrido este tiempo se simuló los procesos de lavado, enjuague y secado de los equipos. El cálculo del porcentaje de recuperación se determinó por la siguiente fórmula:

**% de recuperación de producto**=  $\frac{\text{Peso inicial superficie} - \text{peso final superficie}}{\text{Peso inicial superficie}} \times 100$

#### **4.4.2 Ensayo de porcentaje de recuperación de microorganismos.**

La metodología se estableció teniendo en cuenta el procedimiento para la promoción de crecimiento de medios de cultivos estipulado en la USP Vigente, capítulo <61> Examen Microbiológico /Pruebas Microbiológicas (USP, 2014).

El método de muestreo microbiológico se evaluó de la siguiente manera:

A partir de las cepas de trabajo se obtuvieron cultivos estándar de 3 microorganismos (Ver tabla 10). Se prepararon soluciones en agua peptonada estéril de  $3 \times 10^8$  UFC/mL de cada microorganismo que correspondían al tubo 1 de McFarland (0.1mL de BaCl<sub>2</sub> + 9.9 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). En el caso del hongo y la levadura el tubo 1 de McFarland corresponde a una concentración de  $3 \times 10^2$

A partir del McFarland 1 se realizaron 2 diluciones de 1:100 en agua peptonada buferada obteniéndose un concentraciones final de microorganismo de  $3 \times 10^6$ .

Por último se tomó 0.1 ml de cada una de las diluciones finales de los microorganismos y se inocularon en las diferentes superficies evaluadas (Ver figura 12) (25 cm<sup>2</sup>). Este mismo volumen se diluyó y se inoculó en superficie cajas de medio agar TSA para la confirmación de UFC que fueron inoculadas en las superficies las cuales se llevaron a incubación a 35 °C y 22 °C durante tiempos de 24 y 72 horas.

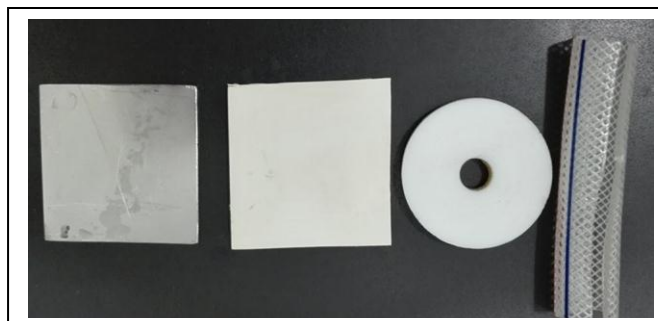
Las superficies inoculadas se dejaron secar durante 30 min, transcurrido este tiempo se realizó el muestro por hisopado. A partir del medio diluyente se tomó un inoculó de 1 ml que se sembró en profundidad por duplicado para el análisis respectivo de los microorganismos.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de UFC/mL y se hizo una comparación con el inoculo inicial de cada uno de los microorganismos impregnados en las superficies de estudio. La Fórmula empleada para determinar el porcentaje de recuperación de microorganismos fue la siguiente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{UFC/ml inoculadas} - \text{UFC/ml obtenida en el agua de enjuague}}{\text{UFC/ml teórico}}$$

**Tabla 10.** Microorganismos y parámetros utilizados en los ensayos del porcentaje de recuperación.

MICROORGANISMO	Volumen inoculado	TIEMPO	VOLUMEN DE AGUA DE ENJUAGUE	SUPERFICIES EVALUADAS
<i>Escherichia coli</i>	0,1 ml	30 min de exposición	9.9 caldo lecitina polisorbato	Acero inoxidable, teflón, plástico y espuma.
<i>Candida albicans</i>				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>				



**Figura 12.** Superficies de los equipos evaluadas. Acero inoxidable, espuma, teflón y Plástico.

## 4.5 PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y QUÍMICOS

### 4.5.1 Parámetros microbiológicos

**Tabla 11** Límite Microbiológico Establecido según USP 37

Microrganismos	ESPECIFICACIÓN	REFERENCIA
<b>Aerobios Mesofilos</b>	<100 UFC/ 25 cm <sup>2</sup>	USP 37
<b>Coliformes Totales</b>	Ausencia	
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Ausencia	
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Ausencia	
<b>Mohos y Levaduras</b>	<100 UFC/25 cm <sup>2</sup>	

En este trabajo el limite microbiológico se ajustó a <50 UFC/ 25 cm<sup>2</sup>

### 4.5.2 Parámetros químicos

**Tabla 12.** Parámetros químicos establecidos según USP 37

PARAMETRO	ESPECIFICACIÓN	REFERENCIA
pH	5.0-7.0	USP 37
Conductividad	2,1 µS/cm	

TOC	<500 ppb	
-----	----------	--

#### 4.5.3 Determinación de los límites de aceptabilidad de residuo de productos, detergente y desinfectantes.

Para establecer los límites aceptables de residuo de productos, detergente y desinfectantes se utilizaron las siguientes formulas:

$$ADI \text{ (mg/día)} = LD_{50} \text{ (mg/Kg)} \times W \text{ (Kg)} \times F \text{ (FS XFC)}$$

$$LAR \text{ (ppm)} = ADI / DDM_{MaxB} \times 10^6$$

#### Dónde:

LAR: Fórmula límite aceptable de residuo

ADI: Consumo aceptable diario

LD<sub>50</sub>: Dosis letal mediana

W: peso del cuerpo humano

F: producto del factor de seguridad (FS) por un factor adicional (FC)

LAR: límite de aceptación de residuos

DDM<sub>MaxB</sub>: Dosis máxima diaria del producto B

#### 4.6 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD).

Se pesaron 11,0400 mg de rutina Lote N. 110k1587 y se disolvieron en 50 ml de metanol Panreac Lote N. 0000570104 concentración final de 0,022%. Seguidamente se tomaron 25 ml de la solución patrón y se llevaron a un matraz aforado hasta 50 ml con metanol concentración 0,011%, se siguieron realizando diluciones 2/1 hasta alcanzar una concentración final de 0,00017187%.

Adicionalmente se realizó un ensayo de recuperación de rutina, tomando 600 µL de las 3 primeras soluciones de rutina y se inocularon en las placas de acero inoxidable de 25 cm<sup>2</sup> durante 20 min, posteriormente se realizó un enjuague con 10 mL de agua purificada, a partir de esta agua se tomaron 8 µL de cada una y se analizaron por CCD.

A continuación se presenta la metodología en general de CCD documentada en el laboratorio de fisicoquímica LABFARVE para los diferentes productos de fabricación. Dicha metodología se adaptó para determinar la presencia del patrón Rutina a diferentes concentraciones. Esta metodología está establecida teniendo como guía el libro Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas (Wagner y Bladt, 1996).

#### **4.6.1 Metodología General CCD.**

Consideraciones previas: La cámara de cromatografía se dejó saturar con el sistema de solvente durante 15 minutos, antes de introducir la placa cromatografía para el desarrollo.

Se lavó con tolueno el pincel y los capilares que se van a utilizar, antes de sembrar la muestra a analizar.

##### **Procedimiento**

##### **A) Preparación de la muestra**

Para soluciones de rutina se sembró directamente 8 uL

Para las aguas de enjuague se llevaron primero se llevaron baño serológico 45 °C hasta sequedad y se resuspendieron en 1 ml de metanol.

##### **B) Preparación del sistema de solvente**

Se prepararon 25 mL del sistema de solvente: Acetato de Etilo – Ácido Fórmico – Ácido acético glacial – Agua (100:11:11:26).

Se adicionaron el sistema de solventes a la cámara cromatográfica.

Se tapó la cámara y dejar saturar el solvente por 10 minutos antes de introducir la placa.

##### **C) Siembra de la muestra y el patrón comatográfico**

Se introdujo la punta del capilar en la muestra a analizar.

En una placa de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Cromatofolio) de 5 cm x 10 cm, ó de 2,5 cm x 10 cm, se realizó la siembra de las muestras así:

Muestra de las soluciones de rutina: se sembró la muestra, en banda o en punto, al lado izquierdo, a un centímetro del borde inferior de la placa de sílica gel y en el lado angosto de la misma.

Muestra del patrón cromatográfico para el análisis de las soluciones de rutina: se sembró la muestra del patrón, en banda o en punto, al lado derecho de la siembra de la muestra del producto terminado.

Muestra del patrón cromatográfico para el análisis de la vigencia: se sembró la muestra, en banda o en punto, en el centro de la placa

#### **D) Desarrollo de la placa cromatográfica**

- Se introdujo la placa en la cámara que tenía el sistema de solvente.
- Se dejó que el sistema de solvente ascendiera a través de la placa.
- Se retiró la placa de la cámara cuando el frente del solvente alcanzó los 0.5 cm, aproximadamente, del borde superior de la placa.
- Se ubicó la placa en forma vertical en la cabina de extracción y se dejó que el solvente se evaporara completamente.

#### **E) Revelado de la placa cromatográfica**

- Se preparó el reactivo revelador Natural Products Polietilenglicol (NP/PEG) de acuerdo con la fórmula del libro oficial de referencia Plant Drug Analysis.
- Se colocó la placa cromatográfica en la cabina de extracción y con un aspersor, a una distancia de 20 cm, se asperjó horizontal y verticalmente con el reactivo revelador.
- Se dejó evaporar el solvente de la misma durante 15 minutos

### **4.7 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL DETERGENTE Y DE LOS DESINFECTANTES.**

#### **4.7.1 Conductividad de los productos.**



Se prepararon diluciones 1:2 hasta obtener valores de los parámetros químicos que estuvieran dentro del límite permitido por la USP, las diluciones se realizaron utilizando un volumen final de 100 ml para los 5 productos seleccionados; valeriana gotas, caléndula jarabe, azucena crema, gualanday polvo. Estas concentraciones de partida se establecieron teniendo en cuenta el límite visible, pues a concentraciones superiores los productos eran evidentes en las soluciones.

Las soluciones se prepararon en recipientes limpios utilizando agua purificada como disolvente y las mediciones de conductividad y pH se realizaron por triplicado.

#### **4.7.2 Conductividad del detergente y desinfectantes.**

Se evaluó el detergente Lauril Éter Sulfato de Sodio al 1% y como desinfectantes se utilizó alcohol etílico 70% y Glutfar plus al 2%.

Para realizar el análisis de residuos se prepararon en el laboratorio las diferentes soluciones con agua purificada y posteriormente se realizó una curva de calibración de conductividad y pH utilizando diluciones 1:2, hasta obtener una conductividad inferior a la establecida por la USP vigente. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### **FASE 3**

#### **4.8 MUESTREO EN PLANTA.**

**4.8.1 Análisis microbiológico en planta de aerobios mesófilos, Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y mohos y levaduras.** (USP, 2014)

El análisis microbiológico se llevó a cabo empleando el muestreo por hisopado. El área muestreada fue de 25 cm<sup>2</sup>, delimitada por una plantilla de acetato de igual área. A continuación se describe el procedimiento:

Una vez finalizado el proceso de LyD en su totalidad, se procedió a tomar las muestras microbiológicas de cada una de las piezas de los equipos a evaluar.

Se utilizaron hisopos (un hisopo para cada pieza) de algodón estériles humedecidos en Caldo Lecitin Polisorbato contenido en tubos.

Se escurrió el exceso de líquido de los hisopos apretando la cabeza de algodón de cada uno de estos contra la pared de los tubos.

Se froto con la cabeza del hisopo en un ángulo de 30° toda la zona de muestreo (Ver figura 13).

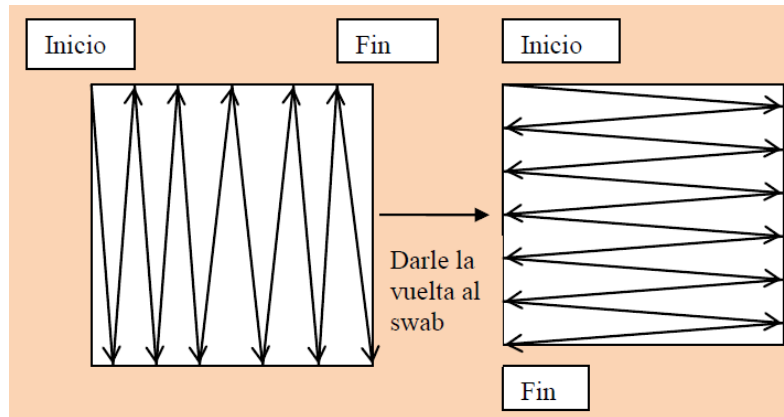
Una vez obtenida las muestras, se introdujeron los hisopos en los tubos con el solvente de extracción para el control microbiológico; posteriormente se transportaron las muestras al laboratorio de microbiología para ser sembradas en un tiempo <4 horas.

Para el análisis microbiológico de Coliformes Totales y *E. coli* se tomó 1 mL del solvente contenido en los tubos y sembró en profundidad, posteriormente se adicionaron 20 mL de medio fundido y atemperado VRBA+MUG. Las cajas se llevaron a incubación por un periodo de 72 horas a 35 °C. Para determinar la Ausencia/Presencia de *Staphylococcus aureus* se utilizó agar Saldo Manitol y el análisis se realizó en las condiciones anteriormente mencionadas.

La siembra de Aerobios mesófilos y mohos y levaduras se llevó a cabo utilizando el procedimiento mencionado anteriormente, pero utilizando medio agar TSA y medio agar sabouraud con cloranfenicol respectivamente. Temperatura de 22 °C por 5 días para el caso de mohos y levaduras.

Para verificar las condiciones de prueba, se realizaron controles negativos y positivos a cada uno de los medios utilizados.

Por último y transcurrido el periodo de incubación se llevó a cabo el recuento de colonias UFC/mL y la determinación de Ausencia /Presencia.



**Figura 13.** Técnica de hisopado (Rivera, 2013)

#### **4.8.2 Análisis de conductividad y TOC**

Al igual que las muestras utilizadas en el análisis microbiológico, las muestras para conductividad y pH fueron tomadas una vez finalizado por completo el proceso de LyD.

Para el caso de conductividad se tomó por separado un volumen de 20 mL en frascos de vidrio limpios de las aguas de enjuague de las diferentes piezas de los equipos, posteriormente se trasladaron al laboratorio de fisicoquímica para determinar la conductividad de estas de acuerdo a lo establecido en el capítulo <645> CONDUCTIVIDAD DEL AGUA de la USP 37.

Las muestras para el análisis de TOC de igual forma fueron tomadas de las aguas de enjuague en un volumen de 1 L de cada agua y en frascos ámbar estériles y posteriormente se enviaron a un laboratorio externo.

#### **4.9. ANÁLISIS DE TIEMPOS DE PERMANENCIA SUCIO**

Teniendo en cuenta que los equipos de la planta de producción de fitoterapéuticos corresponden a equipos no dedicados, el tiempo de permanencia

sucio no se evaluó. Se estableció y documento de que una vez terminado el proceso de fabricación de cualquier producto se debe realizar el proceso de limpieza y desinfección del equipo que haya sido empleado, lo que quiere decir que el tiempo de permanencia sucio en mínimo.

#### **4.10. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ESTABILIDAD DEL DETERGENTE Y LOS DESINFECTANTES.**

La soluciones suministradas por los proveedores y a las preparadas para ser utilizadas durante el mes de LESS 27% y 1%, Alcohol etílico 96% y 70% y Glutfar plus 2%. Se les realizó el análisis microbiológico para determinar aerobios mesófilos y mohos y levaduras cada 10 días durante 1 mes.

#### **4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis estadístico de los resultados se llevó acabo utilizando el programa GraphPad Prism 5. En algunos casos se realizó un análisis de varianza de una vía (simple) y comparación de medias por el test de Bonferroni y para otros casos se realizó el análisis de varianza de dos vías y comparación de medias por fila, test de Bonferroni post-pruebas.

### **5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

**Tabla 13.** Cronograma de actividades

Actividades/Semana	Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2

1	Presentación e inducción	█	█																	
2	Selección del tema de trabajo de grado		█	█																
3	Revisión Bibliográfica			█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█				
4	Diseño de metodología y cronograma			█	█	█														
5	Observación en campo				█	█	█													
6	Acondicionamiento del campo				█	█	█													
7	Ensayos a escala de laboratorio					█	█	█	█	█										
8	Validación del L y D en 3 lotes pilotos de cada producto										█	█	█							
9	Análisis de resultados										█	█	█							
10	Escritura del trabajo de grado		█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█					
11	Entrega del informe para revisión															█				
12	Entrega del Trabajo escrito																	█		
13	Sustentación del trabajo de grado																			█

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ANÁLISIS DEL RIESGO EN EL PROCESO DE LIMPIEZA

El proceso de LyD se estableció inicialmente de manera general, sobre el cual se realizó el análisis del riesgo, dando como resultado 3 etapas críticas en las cuales se pueden desarrollar actividades que ejerzan cambios sobre el resultado que se busca, es decir en la efectividad del proceso. Estas etapas corresponden a

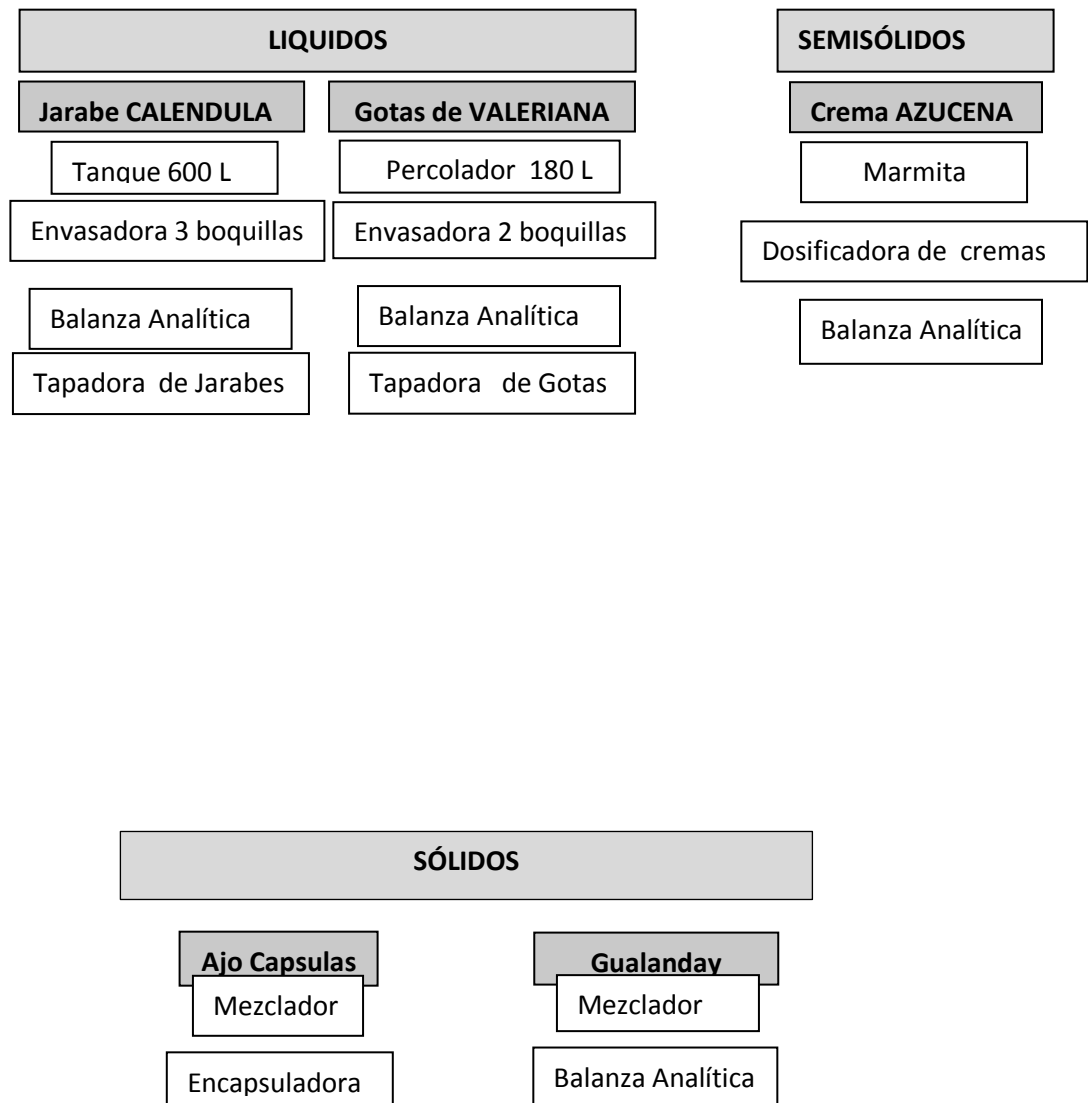
la etapa de limpieza manual, la etapa de lavado-detergente y la etapa de desinfección (Ver tabla 14).

**Tabla 14.** Análisis del riesgo del proceso de limpieza y desinfección general.

Fase del proceso	Riesgo asociado	Probabilidad	Gravedad	Dificultad de detección	Acción requerida
Etapa de limpieza manual	Contaminación química y microbiológica	Alto	Alto	Medio	Capacitación de operarios
Etapa limpieza con aire comprimido	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Etapa de lavado-detergente	Residuos del detergente y reducción de la actividad.	Alto	Alto	Alto	Determinar tiempo de acción y concentración
Etapa enjuague agua potable	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Etapa de enjuague agua purificada	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Etapa de desinfección	Baja actividad antimicrobiana	Alto	Alto	Alto	Evaluación actividad antimicrobiana y Rotación de desinfectantes
Etapa de enjuague agua purificada	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Etapa de secado aire comprimido	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

## 6.2 Descripción De Equipos

Teniendo en cuenta la matriz de selección del peor caso de los productos fabricados en la planta de LABFARVE, en la cual fueron seleccionados: jarabe de caléndula, gotas de valeriana, crema de azucena, ajo capsulas y gualanday polvo (Ver anexo 1); se establecieron los equipos que intervienen en los diferentes procesos de fabricación de dichos productos (Ver figura 14).



Balanza Analítica

**Figura 14.** Equipos que se utilizan en la fabricación de los productos seleccionados como peores casos.

En todos los procesos de fabricación de la planta de fitoterapéuticos se emplean utensilios generales, lo que conlleva a que estos se estén utilizando constantemente, para la validación de L y D solo se seleccionaron 3 utensilios.

### 6.2.1 Utensilios empleados en la fabricación de los productos.

Los utensilios que se utilizan en la fabricación de los productos seleccionados son: tazas Plásticas, tinas plásticas, canecas plásticas 150 L, canastas plásticas 30 L, pala plástica, pala a en acero inoxidable, tinas 30 L, baldes de 12 L, pala de aluminio, cedazo y muselina.

### 6.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS EQUIPOS.

Algunos equipos de la planta presentan la característica de ser desmontables pero otros no, este es el caso de la envasadora de jarabes, a pesar de esto presenta 10 piezas desmontables, a diferencia de otro equipo como la marmita que solo tiene 1 pieza desmontable (Ver tabla 15).

**Tabla 15.** Características de los equipos de la planta de fitoterapéuticos 2016.

CÓDIGO	EQUIPO	DESMONTABLE x 2	FACILIDAD DE LIMPIEZA x 2	PUNTOS DE CONTACTO x 3
1	Percolador	1	No compleja	2
2	Dosificadora	8	Compleja	7



	gotas			
3	Tanque de preparación	2	No compleja	3
4	Dosificadora Jarabe	0	No compleja	10
5	Marmita	1	Medianament e compleja	3
6	Dosificadora cremas	9	Compleja	7
7	Mezclador	1	Compleja	3
8	Encapsuladora	20	Compleja	8
9	Balanza analítica	3	No compleja	1
10	Tapadora de jarabes	3	Medianament e compleja	0
11	Tapadora de gotas	3	Medianament e compleja	0

Los equipos que presentaron mayor RRF fueron a la envasadora de gotas, envasadora de jarabes, dosificadora de cremas, el mezclador y la encapsuladora (Ver tabla 16).

**Tabla 16.** RRF calculado para los equipos.

CÓDIGO	EQUIPO	PIEZAS DESMONTABLE x 2	FACILIDAD DE LIMPIEZA x 2	PUNTOS DE CONTACTO x 3	PONDERACIÓN
1	Percolador	0,5	0,5	0,75	1,75
2	Envasadora de Gotas	1,5	3	4,5	<b>9</b>
3	Tanque de preparación	0,25	0,5	0,75	1,5
4	Envasadora Jarabes	N/A	0,5	4,5	<b>5</b>
5	Marmita	0,5	1,5	0,75	2,75
6	Dosificadora	3	3	4,5	<b>10,5</b>

	cremas				
7	Mezclador	0,5	3	0,75	<b>4,25</b>
8	Encapsuladora	3	3	4,5	<b>10,5</b>
9	Balanza analítica	0,5	0,5	0,5	1,5
10	Tapadora de jarabes	0,5	1,5	0,5	2,5
11	Tapadora de gotas	0,5	1,5	0,5	2,5

#### 6.4 SELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE TOMA DE MUESTRA DE RESIDUOS.

La selección de los puntos de muestreo de los diferentes equipos seleccionados como peor caso se hizo basada en el criterio de que estos puntos presentan contacto directo con los productos que están siendo fabricados, por ende el riesgo de que exista una contaminación física, química o microbiología es mayor durante el proceso. Estos puntos corresponden en determinados casos a piezas que son desmontables o en su defecto a una superficie no desmontable. Algunos equipos como en el caso de la envasadora de gotas arrojaron 7 puntos de muestreo (Ver tabla 17), para la envasadora de jarabes 4 puntos de muestreo (Ver tabla 18), la dosificadora de cremas 7 puntos de muestreo (Ver tabla 19), el mezclado 3 puntos de muestreo (Ver tabla 20) y la encapsuladora 8 puntos de muestreo (Ver tabla 21).

**Tabla 17.** Puntos críticos de la envasadora de Gotas y su superficie total calculada.

Envasadora de Gotas	Punto de muestreo	Superficie total (cm <sup>2</sup> )
Pc 1	Manguera de succión	8000
Pc2	Manguera de descargue	
Pc3	Válvula de entrada	
Pc4	Válvula de salida	
Pc5	Boquilla	
Pc6	Anillos de contacto	
Pc7	Cilindro	



**Figura 15.** Envasadora de Gotas

**Tabla 18.** Puntos críticos de la envasadora de jarabes y su superficie total calculada.

Envasadora de Jarabes	Punto de muestreo	Superficie total (cm <sup>2</sup> )
Pc 1	Orificio de las boquilla de succión	49800
Pc2	Boquilla dosificador 1	
Pc3	Boquilla dosificador 2	
Pc4	Boquilla dosificador 3	



**Figura 16.** Envasadora de Jarabes.

**Tabla 19.** Puntos críticos de la dosificadora de cremas y su superficie total calculada.

Dosificadora de cremas	Punto de muestreo	Superficie total (cm <sup>2</sup> )
Pc 1	Tolva de alimentación	7200
Pc2	Tubería de descargue	
Pc3	Boquilla dosificadora	
Pc4	Dosificador	
Pc5	Embolo	
Pc6	Cubierta del embolo	
Pc7	Cubo	



**Figura 17.** Dosificadora de Cremas

**Tabla 20.** Puntos críticos del mezclador y su superficie total calculada.

Mezclador	Punto de muestreo	Superficie total (cm <sup>2</sup> )
Pc 1	Superficie interna de la tapa acrílico	9494
Pc2	Aspas	
Pc3	Tolva (parte interna)	



**Figura 18.** Equipo Mezclador

**Tabla 21.** Puntos críticos de la encapsuladora y su superficie total calculada.

Encapsuladora	Punto de muestreo	Superficie (cm <sup>2</sup> )
Pc1	Tolva de alimentación	41816
Pc2	Tolva encarriladora	
Pc3	Discos (3)	
Pc4	Base de sellado de las capsulas	
Pc5	Superficie del equipo	
Pc6	Deslizador de capsulas	
Pc7	Erizo	
Pc8	Canal encarrilador	



### **Figura 19.** Encapsuladora Capsugel CAP8

En algunos casos como la dosificadora de cremas el punto que corresponde al cubo) no tiene contacto total con el producto solo una pequeña superficie de este, se pudo observar que las diferentes piezas o puntos de contacto directo de los equipos con el producto no tiene un diseño igual, algunas presentan mayor complejidad (Ver figuras 15, 16, 17, 18 y 19) como el caso de las piezas de la encapsuladora al igual que corresponde al equipo con mayor superficie total de contacto directo con el producto y la menor superficie total de contacto directo se presentó en el equipo dosificador de cremas.

## **6.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DETERGENTE Y LOS DESINFECTANTES.**

Para llevar acabo los ensayos de la actividad antimicrobiana del detergente y los desinfectantes se usaron microorganismos de referencia en este caso ATTC, la selección de los microorganismos se hizo teniendo en cuenta las recomendaciones establecidas en la USP vigente en el capítulo <1072> Desinfectantes y Antisépticos.

Los microorganismos de referencia presentaron las características morfológicas y de tinciones de cada uno de ellos, esto se pudo evidenciar en las tinciones de Gram. Los resultados de la confirmación en medio selectivos y diferenciales para bacterias fueron los esperados.

La cepa nativa fue identificada como *Bacillus subtilis* (Ver Anexos 2). Su morfología correspondía a bacilos Gram positivos.

### **6.5.1 Resultados Método Coeficiente Fenólico.**

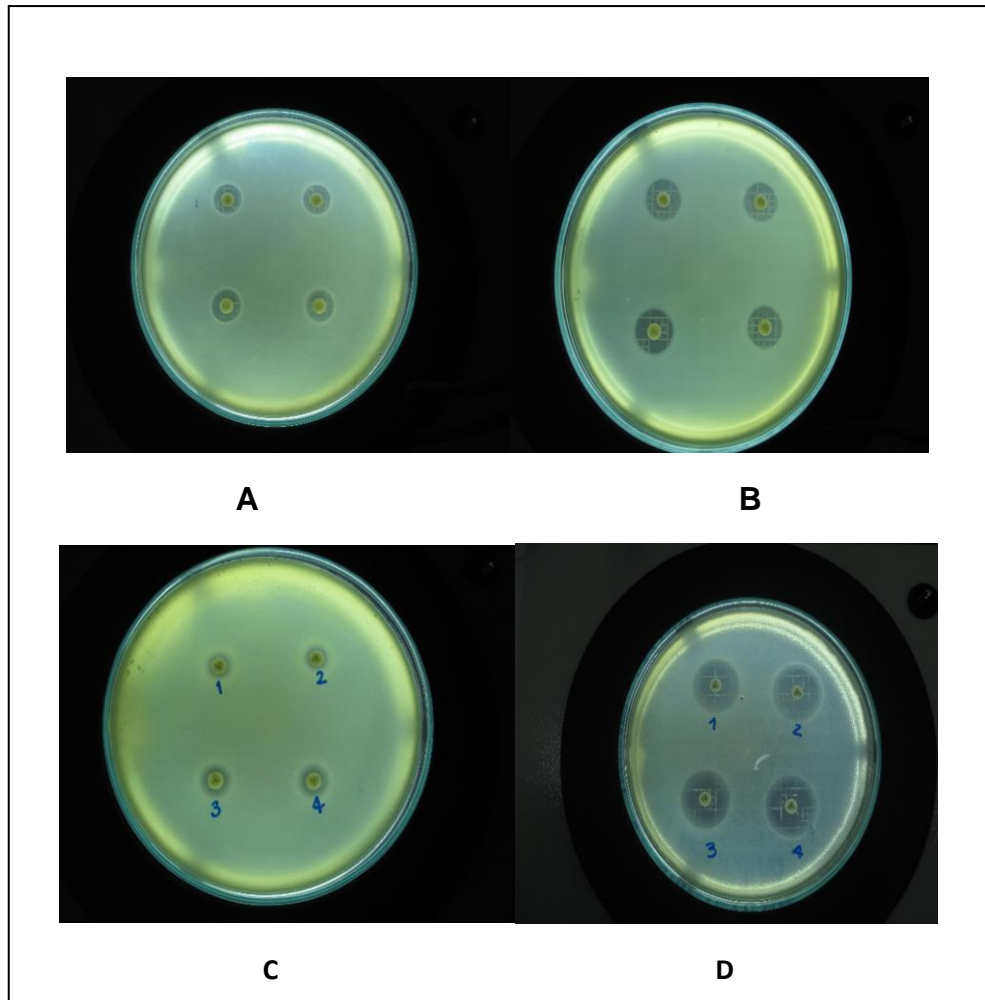
Los resultados obtenidos de coeficiente fenólico para el ensayo con alcohol demuestran que este fue efectivo en un tiempo mayor a 5 min y en una concentración del 90%.

**Tabla 22.** Coeficiente Fenólico del alcohol etílico desafiado con diferentes microorganismos.

Microorganismo	Alcohol etílico	Fenol	Coeficiente fenólico
<i>E. coli</i>	90	90	1
<i>S. aureus</i>	90	70	1.28
<i>Bacillus spezzinii</i>	90	90	1
<i>Bacillus subtilis</i>	90	90	1

### 6.5.2 Resultados Método de difusión en disco (Técnica Kirby –Bauer)

En los ensayos de alcohol etílico al 70% y 90% por el método de difusión de disco permitió evidenciar que su efecto bactericida anteriormente demostrado en el coeficiente fenólico se vio afectado, esto se pudo presentar como consecuencia de la rápida evaporación que se efectúa en alcohol disminuyendo así el tiempo de acción frente al microorganismo (Forero y Piedrahita, 2008) (Ver figura 22).



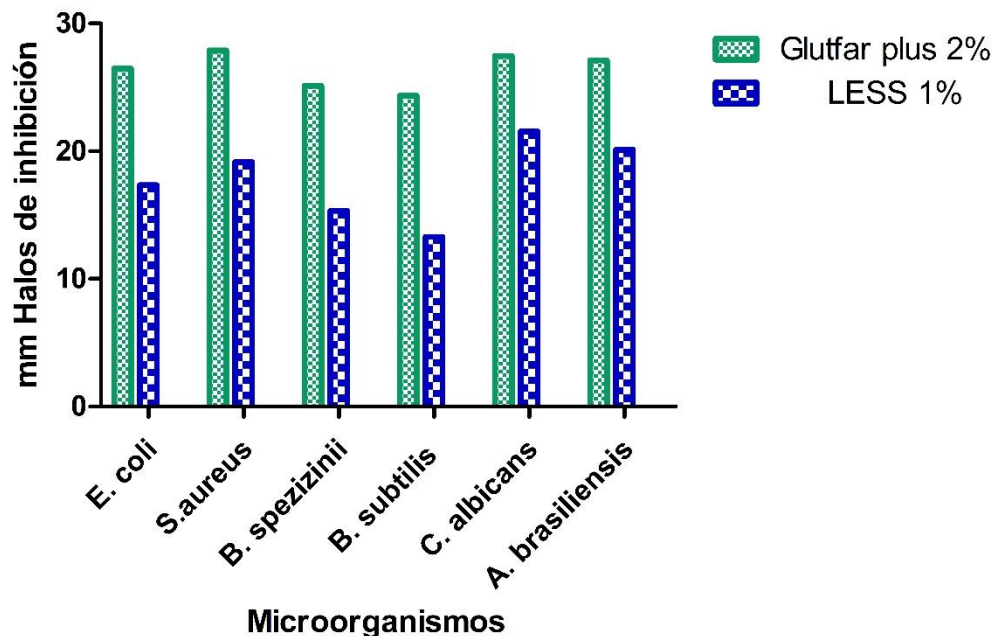
**Figura 20.** Imagen de los resultados del método de difusión en agar (Kirby – Buaer). *Bacillus spezzinii* alcohol al 70% y Glutfar plus al 2% (A yB) Cepas Nativas alcohol al 70% y Glutfar plus al 2% (C y D).

Los microorganismos empleados en el método de difusión en agar *E. coli*, *S.aureus*, *B. espezizinii*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. brasiliensis* fueron sensibles al Glutfar plus al 2%, esto debido a que los resultados de los mm de los halos de inhibición del crecimiento fueron mayores a 20 mm lo cual se interpreta como sensibilidad; siendo más sensibles el moho y la levadura en comparación con los demás microorganismos ensayados.



Teniendo en cuenta los resultados de los halos de inhibición obtenidos en el ensayo con LEES al 1%, el moho y la levadura presentaron sensibilidad ya que los halos fueron mayores a 20 mm, mientras que los microorganismos *E. coli*, *S. aureus* y *B. spezzinii* presentaron halos de entre 15 y 19 mm lo que se interpreta como intermedio y por último los halos de inhibición para *B. subtilis* fueron menores a 14 mm lo que se interpreta como resistente (Ver figura 23). Los controles negativos (agua destilada) no presentaron inhibición y el control de medio no presentó crecimiento.

### Valores de Inhibición- Método difusión en agar



**Figur 21.** Valores de los halos de inhibición del detergente LESS al 1% y el desinfectante Glutar plus 2%. Método difusión en agar.

El glutaraldehído tiene un amplio espectro de acción actúa a nivel de los puentes cruzados de peptidoglucano y el alcohol. Reportes en 1964 y 1965 han demostrado que el glutaraldehído posee una alta actividad antimicrobiana, bactericida y esporicida (Gorma *et al.*, 1980), además de fungicida, virucida y

activo contra micobacterias tuberculosas. Mientras que el alcohol actúan destruyendo la membrana celular y desnaturaliza las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia del agua, poseen un amplio espectro de actividad, actuando sobre bacterias gramnegativas y grampositivas, incluyendo micobacterias, mohos y virus, pero no son esporicidas (Sanchez y Saenz, 2005),

### **6.5.3. Resultados Método de la dilución de uso AOAC 955.15.**

El porcentaje de crecimiento fue mayor para los dos microorganismos *C. albicans* y *A. brasiliensis* en alcohol al 70% con interferente azucena crema 100 ppm, a diferencia del ensayo Gluftar al 2% con el mismo interferente solo se presentó crecimiento en 1 solo tubo esto corresponde al 10% (Ver tabla 23). Pero en general se observó un efecto de inhibición en todos los ensayos pues los porcentajes de crecimiento fueron inferiores al 50%. Lo que sustenta que la materia orgánica en este caso ajo capsulas y crema azucena no presentan ningún efecto interferente en la actividad de los desinfectantes.

Los porcentajes de crecimiento en los ensayos con bacterias a diferencia de mohos y levaduras fueron más altos. En lo que respecta al alcohol al 70% en ninguno de los ensayos se observó la inhibición de *B. subtilis* (Cepa nativa), caso contrario para el Gluftar plus, pues se presentó inhibición en todos los ensayos para este microorganismo (Ver tabla 23), lo que permite concluir que la actividad antimicrobiana no se vio afectada por las concentraciones de materia orgánica en ninguno de los ensayos. En el caso de alcohol solo se observó inhibición del crecimiento para *E. coli* y *S. aureus* en el ensayo alcohol al 70% 100 ppm de ajo, los porcentajes de crecimiento fueron inferiores al 50%. En comparación es más efectivo en Gluftar plus al 2% que el alcohol por su efecto esporicida.

**Tabla 23.** Porcentajes de crecimiento de mohos y levaduras. Método de la dilución de uso AOAC 955.15.

MICROORGANISMO	Alcohol 70% 10ppm Ajo	Alcohol 70% 100ppm Ajo	Alcohol 70% 10ppm crema	Alcohol 70% 100ppm crema	Glutfarl 2% 10 ppm Ajo	Glutfarl 2% 100 ppm Ajo	Glutfarl 2% 10 ppm crema	Glutfarl 2% 100 ppm crema
<i>C. albicans</i>	20	25	25	35	0	0	0	10
<i>A. brasiliensis</i>	15	35	35	45	0	0	5	10
<i>E. coli</i>	20	80	35	85	0	0	0	10
<i>S. aureus</i>	35	75	45	80	0	0	0	5
<i>B. spezzinii</i>	50	85	75	95	0	5	0	15
<i>B. subtilis</i>	55	100	95	100	0	15	5	20

Todos los resultados tanto para los ensayos de mohos y levadura como para bacterias de la prueba 2 fueron negativos al igual que los controles microbiológicos prueba 4 y 5. Por otra parte los resultados de la prueba 3 fueron positivos confirmando la viabilidad de los microorganismos sobre el acero inoxidable.

#### 6.5.4. Ensayo de porcentaje de recuperación de producto.

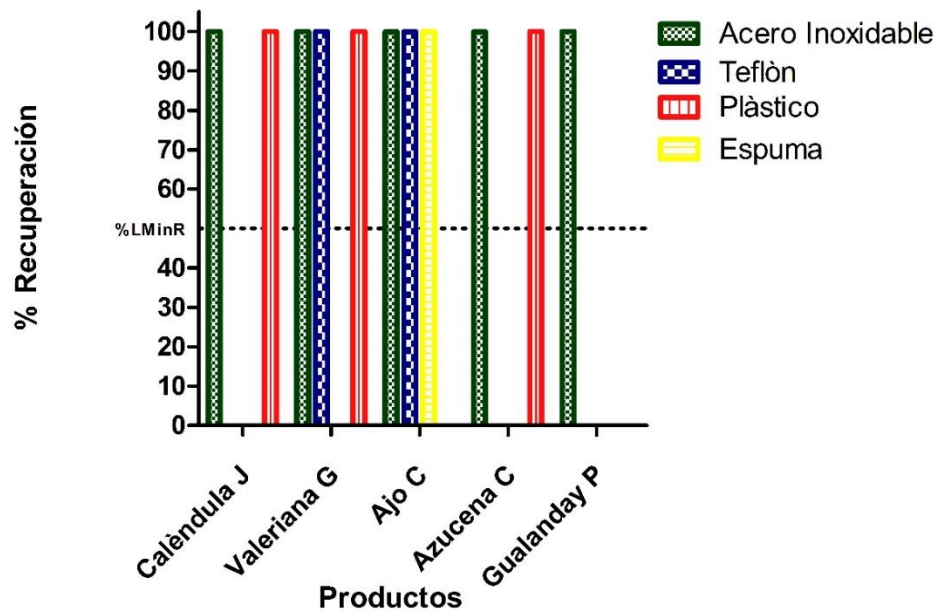
Los 5 equipos seleccionados como peor caso al igual que los demás equipos de la planta de Fito terapéuticos presentan piezas o están fabricados en su totalidad en materiales como: Acero inoxidable, teflón, espuma y plástico. Unos de los requerimientos en el plan de validación de la limpieza y desinfección es evaluar el porcentaje de recobro que es igual al porcentaje de recuperación, por ende se realizaron ensayos en cada una de las superficies anteriormente mencionadas teniendo en cuenta que producto se fabrica en estos equipos que presentan dicho material, por eso en algunos casos se ensayaron 5 productos y en otros solo 1 o 2 productos.

Los porcentajes de recuperación de producto obtenidos en los diferentes ensayos de superficie en general son superiores al 99%. En el acero inoxidable los porcentajes fueron de Caléndula jarabe, valeriana gotas, ajo capsulas,

azucena crema y gualanday polvo fueron de: 99,96%, 99,98%, 99,95%, 99,93% y 99,98% respectivamente, en el caso del teflón para valeriana gotas y Azucena crema fueron 99,97% y 99,92%, para el ensayo con espuma el porcentaje de recuperación de ajo cápsulas fue de 99,91% y por último en lo que respecta a la superficie de plástico los ensayos de jarabe de caléndula, valeriana gotas y azucena crema fueron de 99,97%, 99,99% y azucena crema 99,99% (Ver figura 20).

Hecho que asegura que las superficies facilitan la recuperación o el desprendimiento de los productos siempre y cuando se realicen acciones requeridas o establecidas para facilitar la eliminación de producto.

**Porcentaje de recuperación de los productos sobre las superficies**



**Figura 22.** Porcentaje de recuperación de los productos en cada una de las superficies evaluadas.

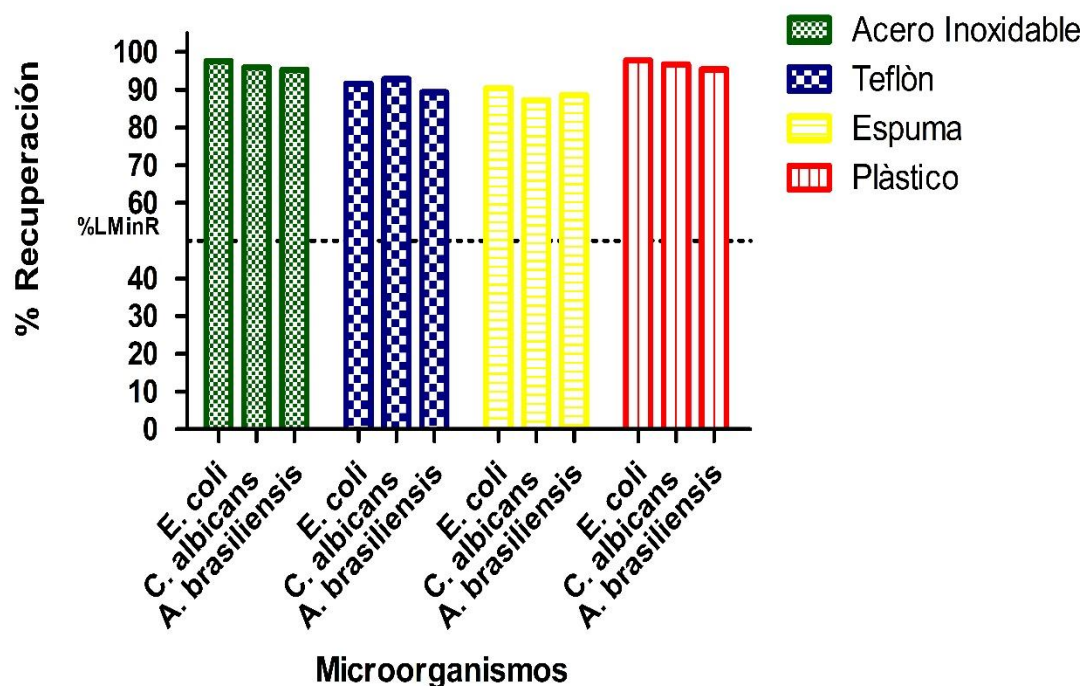
El informe 40 de la OMS en su anexo 4 Validación de limpieza, apéndice 3 del 2016; establece que el porcentaje de recuperación debe ser > 50% en nuestro caso los resultados de porcentaje de recuperación de producto (Ver figura 20) cumplen al ser superiores. Los porcentajes de recuperación más alto se presentaron en el plástico y el más bajo en la espuma. Este ensayo de recuperación de producto se realizó por un método muy sencillo que consistió básicamente en determinar las diferencias de peso al finalizar el lavado de cada una de las superficies ensayadas.

#### **6.5.5. Resultados Ensayo porcentaje de recuperación de microorganismos.**

Los microorganismos a diferencia de los productos son organismos vivos por ende su complejidad aumenta. En los ensayos realizados de porcentaje de recuperación de microorganismos en las mismas superficies ensayadas para el porcentaje de recuperación de producto los resultados fueron inferiores, pero en general del 90% en la mayoría de los casos; se evaluaron solo 3 microorganismos: bacterias, mohos y levaduras.

Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron: ***E. coli*** en acero inoxidable, teflón espuma y plástico 97%, 91,6%, 90,4% y 97,6%, para el caso de *C. albicans* en el mismo orden 96, 92,8%, 87,2% y 97,7% y *Aspergillus* 95,3%, 89,3%, 88,6%, 95,4%. Dentro de los porcentajes de recobro en el que menor porcentaje se obtuvo fue en el ensayo de recuperación de ***Aspergillus brasiliensis*** en las superficies de espuma y teflón siendo inferior el porcentaje en el ensayo con la espuma (Ver figura 21), esto se pudo haber presentado debido a dos factores uno es su morfología y el otro es a características de la superficie debido a que esta es adherente y si se ejerce cierto grado de fuerza para asegurar el desprendimiento se acelera el deterioro de la misma, dificultando así la recuperación total tanto de los productos como de los microorganismos.

## Porcentaje de recuperación de los microorganismos sobre las superficies



**Figura 23.** Porcentajes de recuperación de los microorganismos en cada una de las superficies evaluadas.

Existen diferentes tipos de detergentes y desinfectantes utilizados en la industria farmacéutica, unos se emplean fácilmente sobre cualquier superficie otros no debido a que ocasionan la oxidación o deterioro de esta. Los detergentes y desinfectantes utilizados en la limpieza y desinfección son adquiridos con ficha técnica y estudios soportados que demuestran su actividad biocida, dentro del proceso de validación se deben realizar ensayos que demuestran su actividad, por ende en este trabajo se realizaron tres métodos microbiológicos estandarizados como lo fue el coeficiente fenólico, método de difusión de agar (técnica Kirby-Bauer) y Método de la dilución de uso AOAC 955.15 para determinar la actividad antimicrobiana de un detergente y dos desinfectante .

El método del coeficiente fenólico está descrito por la AOAC y es se utiliza para determinar la eficiencia bactericida de un compuesto químico con relación al fenol. Este método se empleó para determinar la actividad antimicrobiana solamente del alcohol etílico, debido a su rápida evaporación que dificulta su actividad al ser ensayado por otro método.

## 6.6. LÍMITE DE RESIDUOS ACEPTABLE DE PRODUCTOS, DETERGENTE Y DESINFECTANTE

El límite establecido para el proceso de validación se basó en el límite aceptable de residuo, en nuestro caso al tratarse de productos cuyo materia prima es vegetal estos valores fueron muy altos lo que está directamente relacionado con baja toxicidad es el caso de Ajo Capsula y Valeriana gotas. La FDA establece que si el LAR determinado es mayor que el valor por defecto 10 ppm se debe seleccionar este último como límite, siendo así los 5 productos seleccionados como peores caso se ajusta a esta especificación. En el caso del detergente y los desinfectantes igualmente su límite se ajustó a este valor por defecto. Algunos productos como lo es azucena crema y gualanday polvo no se tiene conocimiento de la dosis máxima diaria pues son productos de uso diario y su dosis se deja a criterio del cliente.

Ejemplo Jarabe de Caléndula

$$\begin{aligned} \text{ADI (mg/día)} &= \text{LD}_{50} \text{ (mg/Kh)} \times \text{peso corporal} \times \text{factor de seguridad} \\ \text{ADI} &= 5000 \text{ mg/Kg} \times 70 \text{ Kg} \times 100000 \\ \text{ADI} &= 3500000000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LAR} &= \text{ADI} / \text{DDMaxB} \times 10^6 \\ \text{LAR} &= 3,5 \times 10^6 / 3 \times 10^9 \\ \text{LAR} &= 11,66 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Lauril Eter Sulfato de sodio

$$\begin{aligned} \text{ADI (mg/día)} &= \text{LD}_{50} \text{ (mg/Kh)} \times \text{peso corporal} \times \text{factor de seguridad} \\ \text{ADI} &= 5000 \text{ mg/Kg} \times 70 \text{ Kg} \times 100000 \\ \text{ADI} &= 3500000000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LAR} &= \text{ADI} / \text{DDMaxB} \times 10^6 \\ \text{LAR} &= 3,5 \times 10^6 / 3 \times 10^9 \\ \text{LAR} &= 11,66 \text{ ppm} \end{aligned}$$

**Tabla 24.** Límites aceptables de los residuos de productos, del detergente y desinfectantes.

SUSTANCIA	LD <sub>50</sub>	DDMaxB	PPM DEL RESIDUO
Capsulas Ajo	3034 mg/Kg	300 mg/día	707
Caléndula Jarabe	5000 mg/Kg	3000 mg/día	11.66 ppm
Valeriana Gotas	3300 mg/kg	700 mg/día	330 PPM
Azucena Crema	1428 mg / kg	N	10 ppm
Gualanday Polvo	7490,98 mg/Kg	N	10 ppm
Lauril Eter Sulfato de Sodio	2000 mg/Kg	N	10ppm
Alcohol	3450 mg/Kg	N	10 ppm
Glutaraldehido	134 mg/Kg	N	10 ppm

N: ninguna

Debido a que la FDA establece que si el límite de residuos aceptable de determinada sustancia es mayor que el valor por defecto, se debe seleccionar este último como límite de residuo permitido. Teniendo en cuenta el límite de residuo aceptable para nuestros productos, detergente y desinfectantes es de 10 ppm.

### 6.6.1 Ensayos del principio activo rutina

La cromatografía de capa delgada se utiliza actualmente en el laboratorio LABFARVE como método analítico cualitativo para demostrar la presencia de los compuestos activos del principio activo en los diferentes productos que allí se fabrican. Es un método analítico muy recomendado para ser utilizado en los procesos de validación de limpieza, debido a su costo pues es inferior al método de cromatografía líquida de alta resolución. En este trabajo se realizó un pequeño ensayo en el cual se quería evidenciar mediante CCD hasta qué concentración del principio activo de rutina era observable, obteniéndose como que sólo se pudieron observar bandas en las primeras cuatro soluciones del principio activo 0,022%, 0,011%, 0,0055% y 0,00275% (Ver figura 24), mientras que para las concentraciones de 0,001375%, 0,0006875%, 0,00034375% y 0,000171875% no se observaron bandas; siendo así esa última dilución en la cual se observó la banda equivaldría a 27 ppm haciendo una pequeña comparación de esta concentración con el límite de residuo permitido para el producto caléndula en el cual su principio activo es la rutina, se evidenció que mediante este método



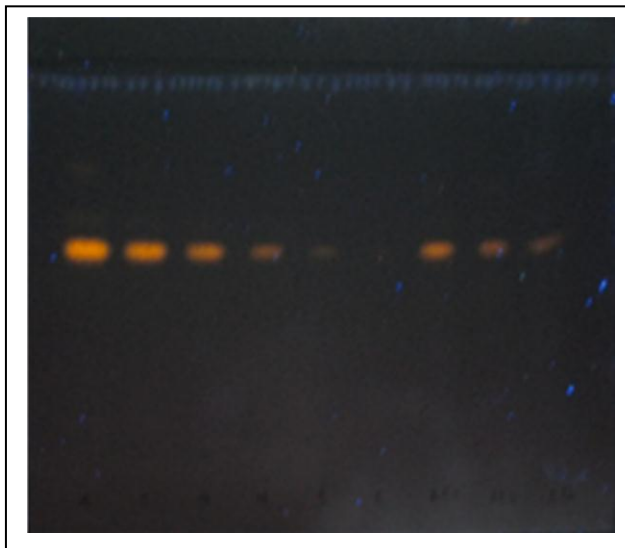
analítico no se permite demostrar la presencia de concentraciones por debajo de 27 ppm.



**Figura 24.** Placa cromatográfica de las soluciones del principio activo Rutina

### **6.6.2 Ensayo del principio activo rutina en agua purificada.**

El ensayo de análisis cualitativo por cromatografía de capa delgada de las 3 concentraciones iniciales del principio activo rutina después de ser recuperadas de la superficie de acero inoxidable, material del cual están fabricados los diferentes equipos seleccionados para la validación del proceso de LyD. Se observaron (Ver figura 25) las bandas, esto se pudo evidenciar gracias a que la superficie ensayada en este caso permite la recuperación del principio activo, pero aun siendo así, las bandas observadas son superiores en concentración con el valor establecido como límite aceptable de residuo para el jarabe caléndula 10 ppm.



**Figura 25.** Placa cromatográfica de las aguas de enjuague con el principio activo Rutina

### **6.7 Curva de Calibración de conductividad y pH del detergente, desinfectantes y productos.**

Todos los ensayos de conductividad realizados de detergente, desinfectantes y productos se desarrollaron con agua purificada que presentó una conductividad de  $1,63 \mu\text{s}/\text{cm}$  y pH 6,8. Los resultados de conductividad en el caso del detergente LESS se iniciaron con una concentración de 10500 ppm (Solución 1) con conductividad y pH de  $9738,53 \mu\text{s}/\text{cm}$  y 8,72; la conductividad establecida por la normatividad se obtuvo en la concentración de 0,0803 ppm (solución 18) con un valor de conductividad de  $1,7 \mu\text{s}/\text{cm}$  y pH de 6,96 (Ver figura 26). Teniendo en cuenta el valor por defecto 10 ppm establecido para este detergente, el parámetro de conductividad en este caso permite demostrar la ausencia o presencia de concentraciones del detergente en este caso LESS al 1%.

Curva de conductividad del detergente LESS

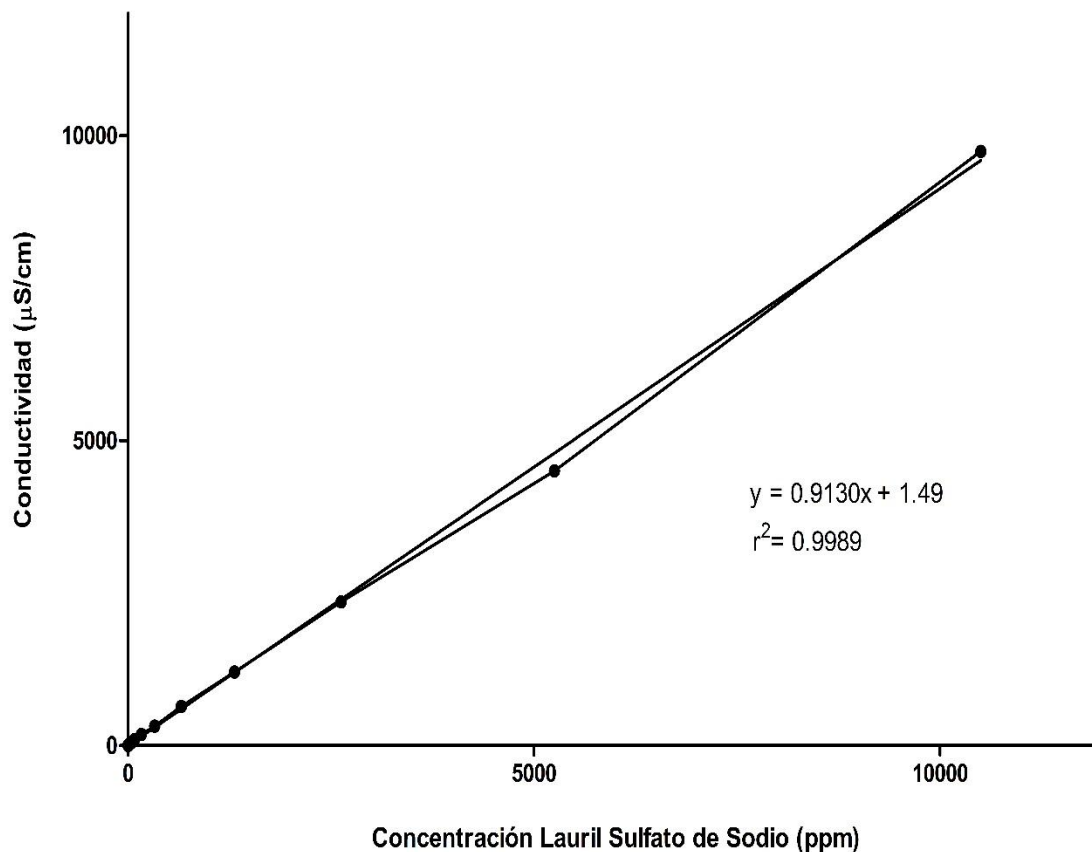
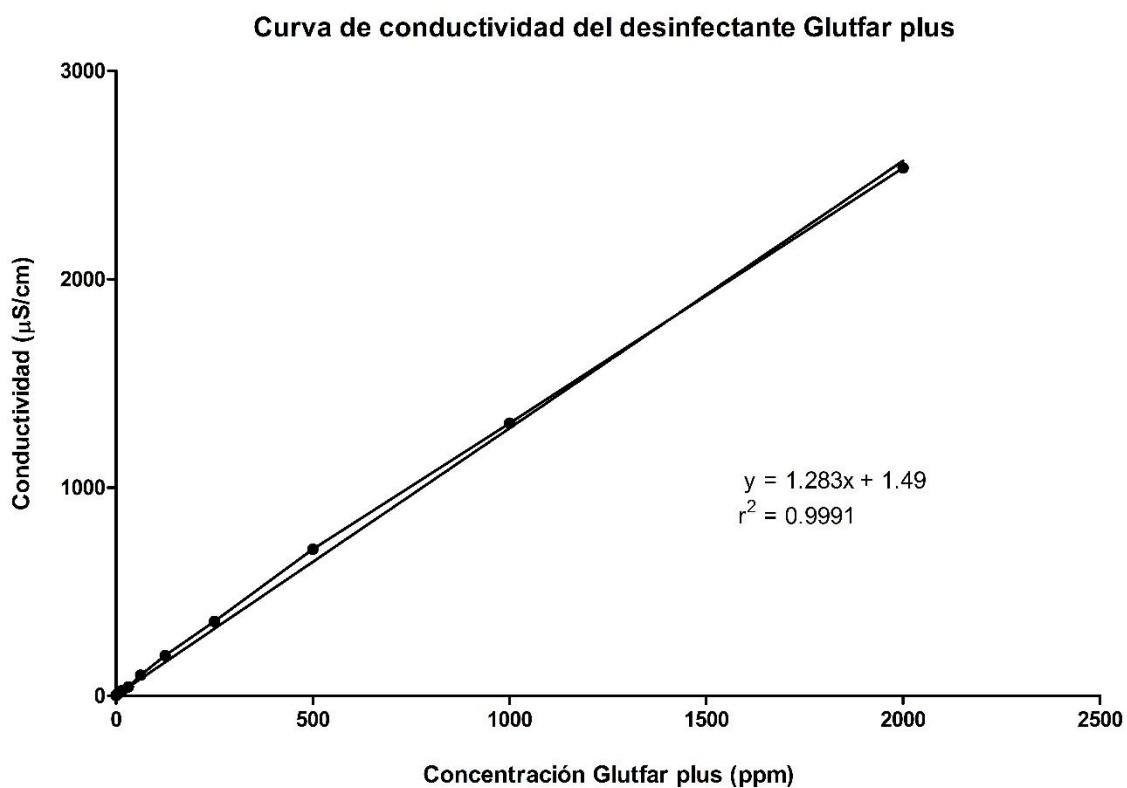


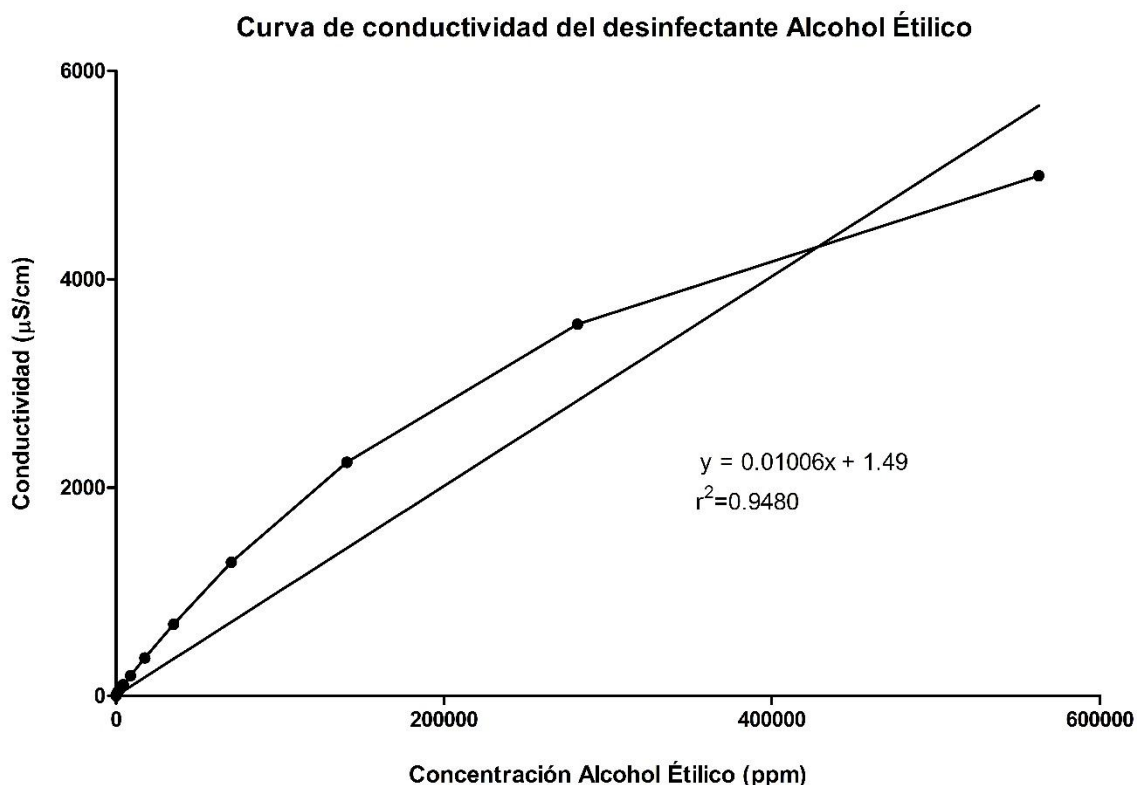
Figura 26. Curva de conductividad del detergente LESS

Para el caso del Glutfar plus se inició a una concentración de 2000 ppm (solución 1) con un valor de conductividad de 2534 µS/cm y pH 8,12 y en la concentración 0,12 ppm (solución 15) se obtuvo una conductividad de 1,77 y pH de 7.0 (ver figura 27). De igual forma se alcanzó la concentración del LAR para este desinfectante 10 ppm.



**Figura 27.** Curva de conductividad del desinfectante Glutfar plus.

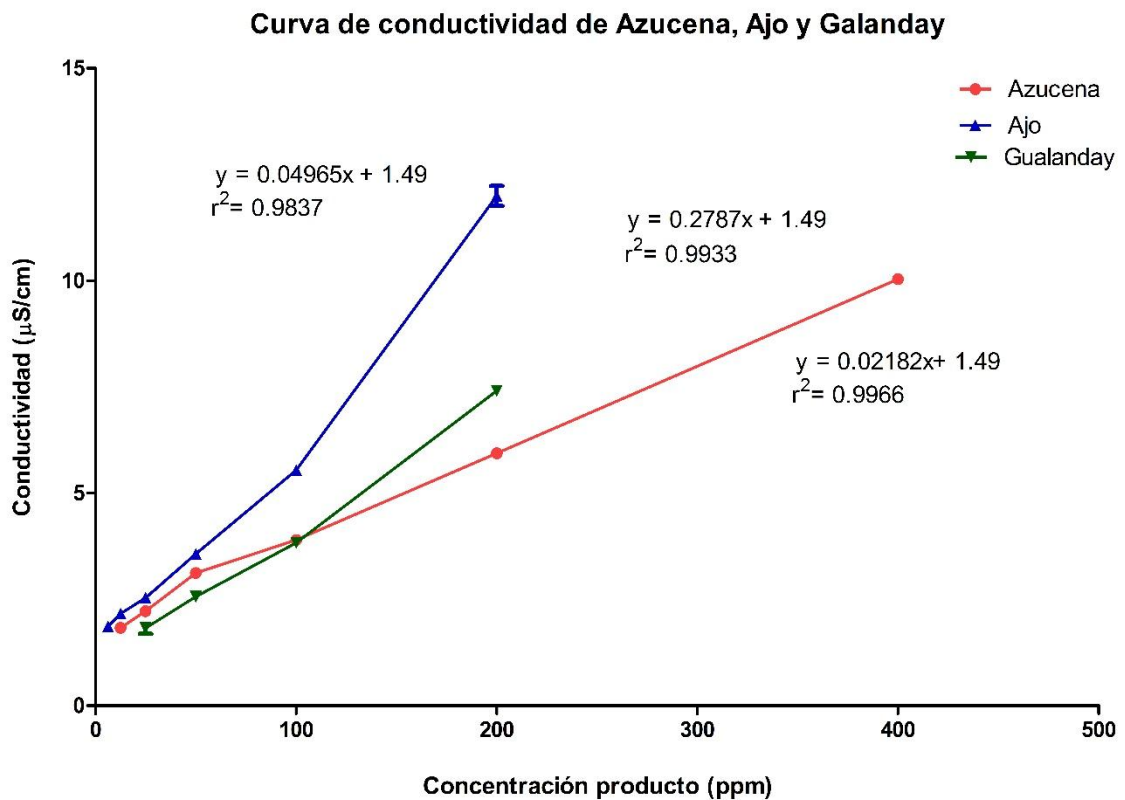
Para el alcohol se inició con 562730 ppm (solución 1) que presentó una conductividad 4991.2 µs/cm y pH de 4,99, la conductividad especificada se alcanzó en la concentración de 0,50 ppm (Solución 21) con conductividad de 1.89 µs/cm y pH 6,65 (Ver figura 28). En este caso también se determinó el LAR para el alcohol etílico.



**Figura 28.** Curva de conductividad del desinfectante Alcohol Étílico.

Las concentraciones iniciales de los productos a partir de las cuales se realizaron diluciones se establecieron teniendo en cuenta que la presencia del producto no fuera fácilmente visible. Los resultados de los productos sólidos y semisólidos se agruparon debido a su similitud. En lo que respecta a el ensayo para azucena crema se inició con una concentración de 4000 ppm (solución 1) con conductividad y pH de 10.35 µS/cm y 7,23, para alcanzar los valores de pH y conductividad establecidos se hizo necesario realizar diluciones hasta 12.5 ppm (solución 6) obteniéndose una conductividad y pH de 1.83 µS/cm y 6,9. En los ensayos de ajo cápsulas se inició con una concentración de 200 ppm (Solución 1) con conductividad y pH de 11.96 µS/cm y 7,12, se realizaron diluciones hasta la concentración 6.25 ppm con valores de 1.86 µS/cm y 6,8. Para el caso de Gualanday polvo la concentración inicial fue de 200 ppm (solución 1) con conductividad y pH de 7.41 µS/cm y pH de 5,47, hasta alcanzar los parámetros en

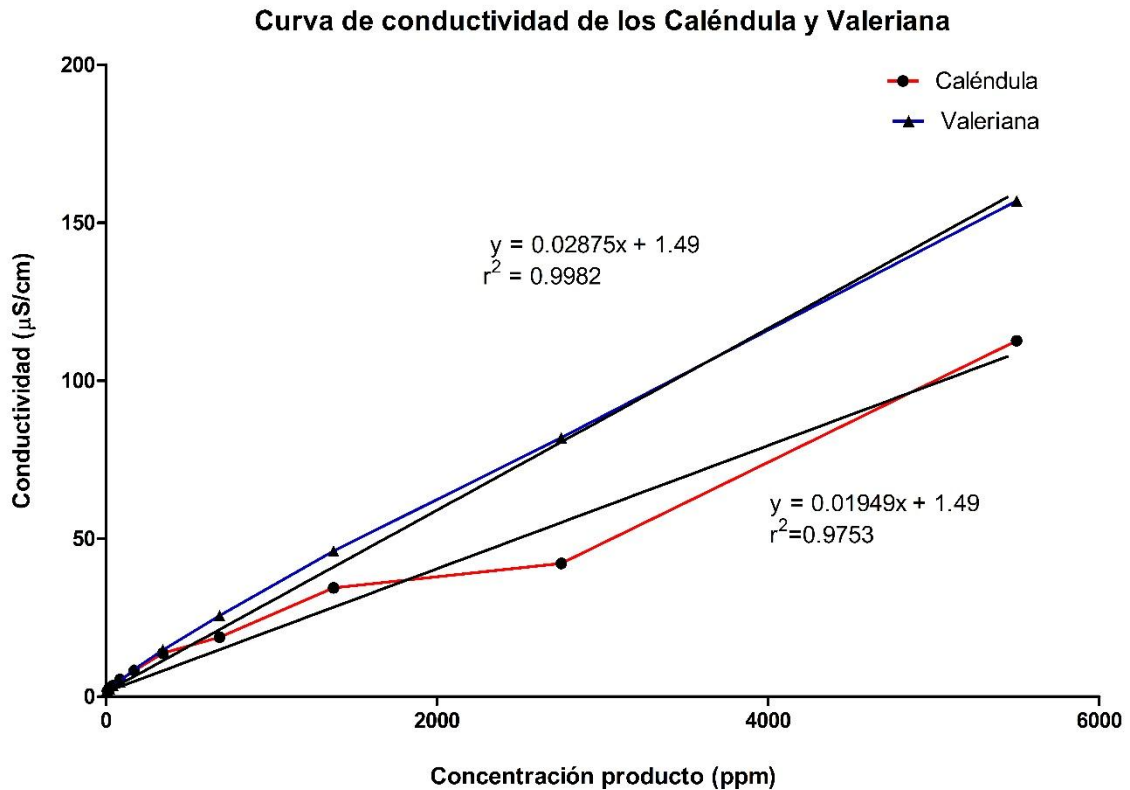
la concentración 25 ppm (solución 5) conductividad de 1.82  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y pH de 6.7 (Ver figura 29). Estos resultados fueron tomados por triplicado.



**Figura 29.** Curva de conductividad de los productos Ajo Capsulas, Azucena Crema y Galanday Polvo.

Los productos líquidos de los peores casos presentaron cierta similitud. En los resultados en lo que corresponde al jarabe caléndula se inició con la concentración 5500 ppm con conductividad de 112,65  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y pH de 7,1, seguidamente se alcanzaron los valores objeto en la concentración de 10,74 ppm (solución 10) con conductividad de 1,76  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y pH de 6,8. Para el caso de valeriana gotas se la solución inicial correspondía a la concentración de 5500 ppm con conductividad de 156,85  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y pH de 4,5, se alcanzó los valores en

la concentración de 5,37 ppm en la (solución 11) con una conductividad de 1,85  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y pH 6,9 (Ver figura 30).



**Figura 30.** Curva de conductividad de los productos Caléndula Jarabe y Valeriana Gotas.

La medida de la conductividad en estos ensayos permitió determinar el límite de residuo establecidos de 10 ppm para el detergente, desinfectantes y 4 de los 5 productos, pues para el caso de jarabe de caléndula se alcanzó la conductividad y pH en la concentración 10,74 ppm.

## 6.8 INSTRUCTIVOS ESTABLECIDOS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE EQUIPOS

- Procedimiento de Limpieza y Desinfección Encapsuladora. (Ver anexos 4)
- Procedimiento de Limpieza y Desinfección de Mezclador. (Ver anexos 4)

- Procedimiento de Limpieza y Desinfección Dosificadora de Jarabe. (Ver anexos 4)
- Procedimiento de Limpieza y Desinfección Dosificadora de Crema. (Ver anexo 4)
- Procedimiento de Limpieza y Desinfección Dosificadora de Gota. (Ver anexo 4)

## **6.9 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LA PLANTA DE FITOTERAPÉUTICOS.**

El desarrollo de esta fase 3 implicó que se cumplieran a cabalidad todos los prerrequisitos anteriormente mencionado en la metodología y corresponden a la fase 1.

Los ensayos a escala de laboratorio mediante los cuales se determinaron parámetros o condiciones como lo fueron tipo de detergentes y desinfectantes, concentraciones, tiempos de acción y en algunos casos actividades adicionales dentro de los procedimientos que permitieran un efectivo proceso; fueron el soporte necesario para diseñar los nuevos procedimientos del proceso de limpieza y desinfección en particular de los 5 equipos evaluados en este trabajo.

Una vez establecidos estos POES, se llevó a cabo la fase 3 en la cual se realizó el desafío o la validación de estos procedimientos en la planta de fitoterapéuticos del laboratorio LABFARVE. Cabe mencionar que antes de dar paso a la ejecución de los procedimientos se llevó a cabo la capacitación con los operarios en su totalidad pertenecientes al área de producción, pues son los encargados de realizar la limpieza y desinfección de los equipos. Una vez dado a conocer los procedimientos se elaboraron 3 lotes pilotos de cada uno de los productos, Valeriana Gotas, Caléndula Jarabe, Azucena crema, Gualanday polvo y Ajo capsulas. Estos lotes fabricados no fueron comercializados debido a que así se encuentra estipulado por normatividad. Durante los procedimientos se realizó una supervisión constante en la planta para asegurar que los estos se realizaran siguiendo los lineamientos establecidos, esto debido a que el proceso en su mayor parte es manual.



Durante la evaluación en los lotes pilotos se tuvieron en cuenta parámetros químicos como lo fueron pH, conductividad y TOC (carbono total orgánico) y análisis microbiológicos como lo fue el recuento de Aerobios mesófilos, mohos y levaduras y la Ausencia/Presencia de patógenos de importancia farmacéutica, los cuales fueron: coliformes fecales, *E. coli* y *S. aureus*. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo mediante hisopado de cada uno de los puntos seleccionados por equipo.

Cantidades de producción de cada uno de los lotes pilotos de los productos seleccionados como peores caso y las respectivas fechas de fabricación.

#### **EQUIPO DOSIFICADOR DE GOTAS**

**Producto:** Gotas de valeriana

**Cantidad:** 250 unidades (60 mL)

#### **EQUIPO DOSIFICADOR DE JARABES**

**Producto:** Jarabe de Caléndula 360 mL

**Cantidad:** 180 unidades

**.Fecha:** 23/11/2016

#### **EQUIPO DOSIFICADORA DE CREMAS**

**Producto:** Azucena crema 60 gr

**Cantidad:** 6 Kg

**Fecha:** 24/11/2016

#### **EQUIPO MEZCLADOR**

**Producto:** Polvo de gualanday

**Cantidad:** 5 Kg

**Fecha:** 23/11/2016

#### **EQUIPO ENCAPSULADORA**

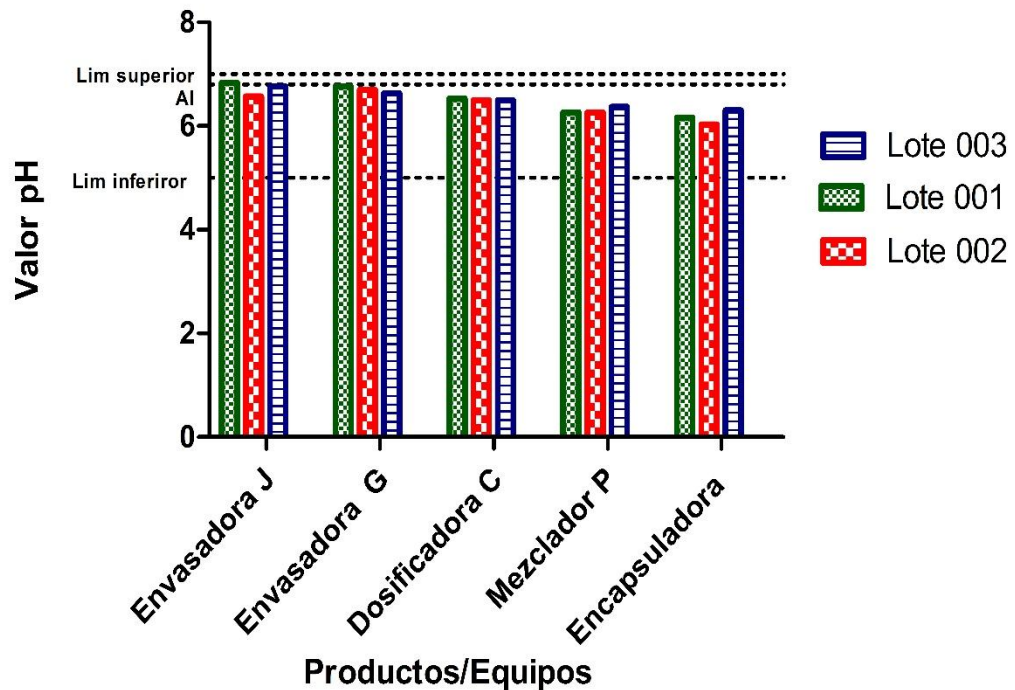
**Producto:** Ajo desodorizado 60 capsulas

**Cantidad:** 3 kilos (total 140 frascos)

### 6.9.1 Resultados de pH de las aguas de enjuague de los Equipos.

Los resultados de valores promedio de pH obtenidos, permiten observar que en lo que corresponde a las aguas de enjuague de los 3 lotes pilotos de caléndula gotas y valerianas gotas se encuentran cercanos al pH del agua de inicio, mientras que los pH de Azucena crema, Gualanday polvo y Ajo capsulas se encuentran por debajo del pH del agua de inicio (Ver figura 31), aun siendo así todos los valores de pH de los lotes pilotos de los diferentes productos se encuentran dentro del límite permitido por la normatividad, lo que quiere decir que las aguas de enjuague cumplen a totalidad las especificación.

**Valores de pH de 3 lotes pilotos de los productos**



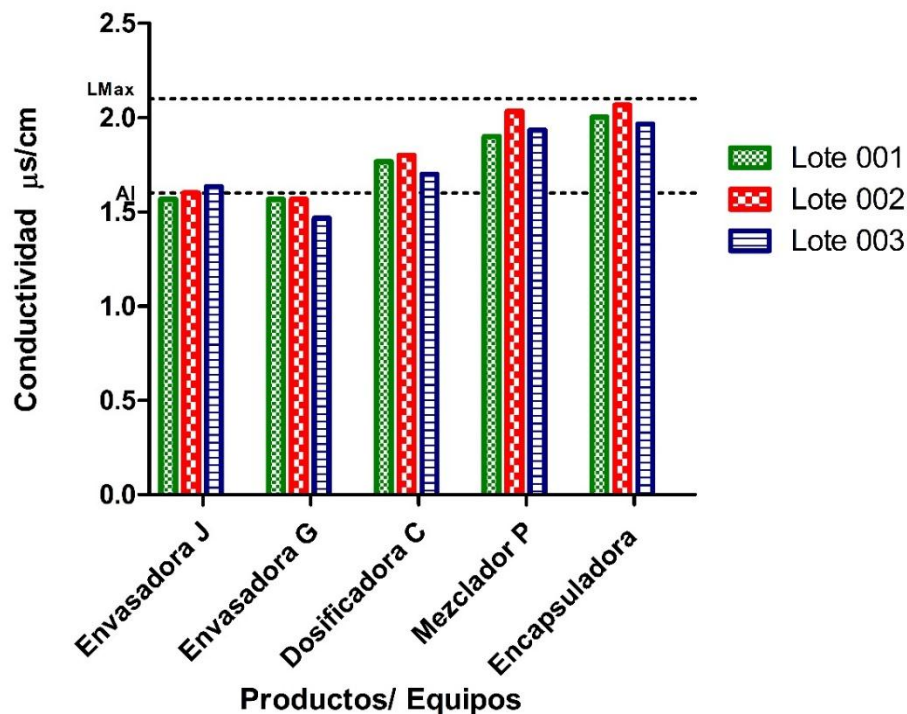
**Figura 31.** Valores de pH de los 3 lotes pilotos de cada uno de los 5 productos/Equipos.

No existen diferencias significativas a un valor de  $p < 0,05$  en los valores de pH de las aguas de enjuague del equipo envasadora de jarabes durante la medición en los tres lotes pilotos del jarabe de caléndula, ni en los lotes de la envasadora de gotas con el producto valeriana gotas, tampoco en la dosificadora con el producto azucena crema, ni en los lotes de gualanday polvo para el mezclador, caso contrario se evidencio en los valores de pH de las aguas de enjuague del equipo encapsulador donde se fabricaron los lotes pilotos de ajo capsulas en los cuales se presenta diferencias significativas en todos los lotes siendo el lote 3 el que presenta mayor diferencia frente a los demás (Ver Anexos 5).

### **6.9.2 Resultados de conductividad de las aguas de enjuague de los Equipos.**

El agua utilizada en la industria farmacéutica debe cumplir unos requisitos de calidad sumamente estrictos como lo es el valor de conductividad. Durante la validación de los procedimientos de LyD los resultados de conductividad de las aguas de enjuague de los 3 lotes pilotos de cada uno de los equipos no presentan diferencias significativas entre ellos con una confiabilidad del 95%. Se pudo establecer (Ver figura 32 ) que los valores de conductividad fueron similares en los lotes de caléndula y valeriana, mientras que por el contrario la conductividad de las aguas de enjuague de los equipos dosificadora de cremas, mezclador y encapsuladora sus valores de conductividad son superiores a la conductividad del agua de inicio pero a pesar de estos incrementos todas los resultados de conductividad de las aguas de enjuague se encuentran dentro del límite permitido que corresponde a  $2,1 \mu\text{s}/\text{cm}$  (Ver Anexos 5).

### Valores de conductividad de 3 lotes pilotos de los productos



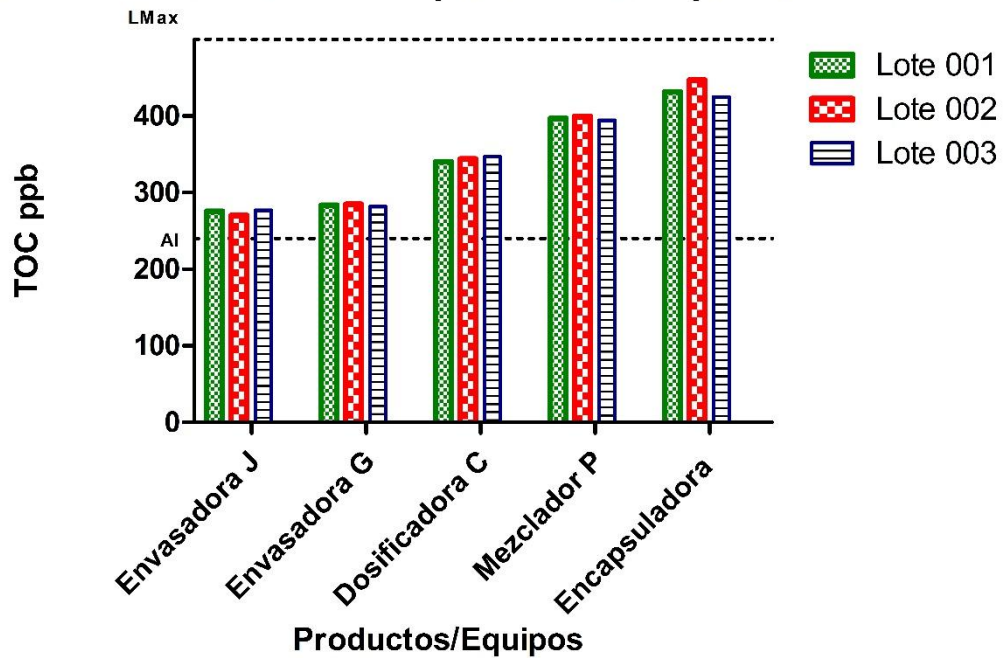
**Figura 32.** Valores de conductividad de los 3 lotes pilotos de cada uno de los 5 Productos/Equipos.

#### 6.9.3 Resultados de TOC de las aguas de enjuague de los Equipos.

El análisis de TOC es un método inespecífico, es decir no determina que compuestos concretos están presentes en dado caso si el resultado es superior al permiso por la normatividad <500 ppb, lo que conllevaría a pensar que se puede tratar de residuos de producto, de detergentes o en dado caso de desinfectantes o microorganismos (la mayoría de las muestras son mezclas complejas que contienen miles de compuestos de carbono orgánico diferente. Los análisis de TOC fueron determinados en un laboratorio externo debidamente certificado, de esta manera a partir de los resultados obtenidos de TOC se observó que las aguas de enjuague de los equipo envasadora de jarabes y envasadora de gotas presentaron similares valores de conductividad cercanos al agua de inicio; mientras que los resultados de TOC de los equipos dosificadora de cremas, mezclador y encapsuladora presentaron valores de TOC más altos que fueron incrementándose en este mismo orden (Ver figura 33) . Aunque se observó este

comportamiento todos los valores de TOC de las aguas de enjuague de los diferentes equipos se encuentran dentro del límite permitido. Al igual que no se encontraron diferencias significativas entre los lotes de un mismo equipo (Ver Anexos 5).

**Valores de TOC de 3 lotes pilotos de los productos**



**Figura 33.** Valores de TOC (carbono orgánico total) de los 3 lotes pilotos de cada uno de los 5 Productos/Equipos.

#### 6.9.4 Resultados Microbiológicos de los Equipos.

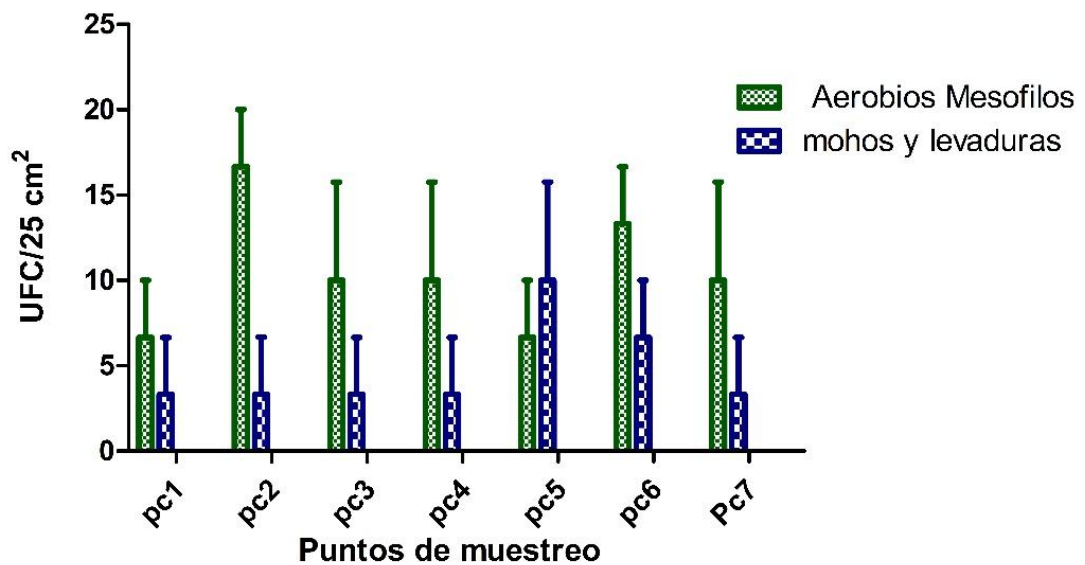
##### 6.9.4.1 Resultados microbiológicos de la Envasadora de gotas.

Los parámetros microbiológicos de productos no estériles de la industria farmacéutica en este caso del laboratorio LABFARVE son bastante flexibles en lo que corresponde a aerobios mesófilos 10000 UFC/ml/gr, caso contrario para

hongos-levaduras y patógenos pues los límites son 1000 UFC/ml/gr y ausencia respectivamente. Aun siendo así los límites microbiológicos internos de aerobios mesófilos y mohos y levaduras para superficies del laboratorio LABFARVE son de 50 UFC/25 cm<sup>2</sup>. Es de suma importancia mencionar que el agua utilizada, el detergente y el desinfectante utilizado durante los procedimientos presentaban la ausencia de cualquier tipo de microorganismo.

Durante el proceso de validación de los procedimientos de LyD diseñados los resultados microbiológicos de cada uno de los puntos de muestreo por equipo demuestran que en el caso de la envasadora de gotas todos los recuentos microbianos se encuentran dentro de límite permitido y por debajo de 20 UFC/ 25 cm<sup>2</sup>, siendo el punto Pc2 seguido del pc6 los que mayor recuento presentan; Se determinaron diferencias significativas a nivel de aerobios mesófilos y mohos y levaduras, pero no hay diferencias a nivel de los puntos de muestreo (Ver figura 34).

### Recuento Microbiológico de la Envasadora de Gotas

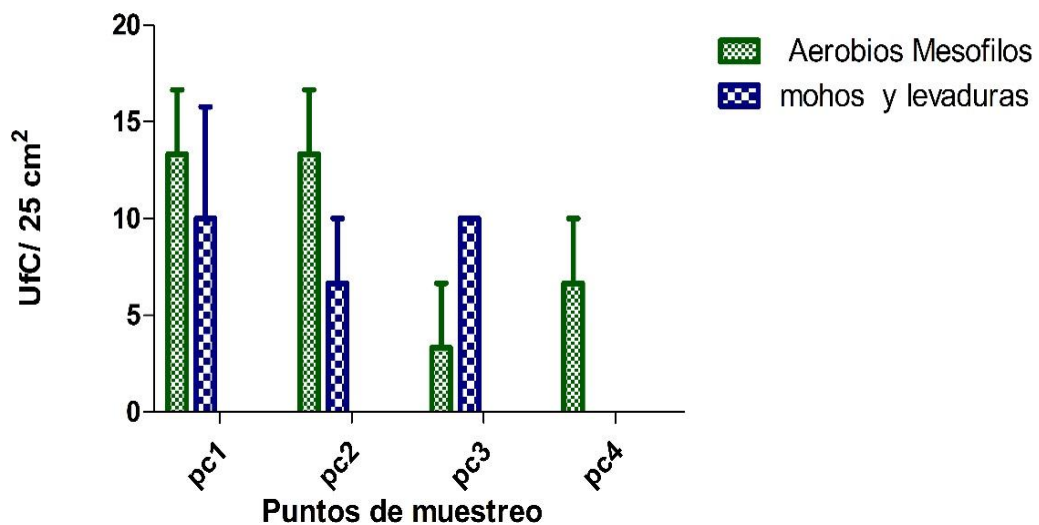


**Figura 34.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la envasadora de gotas en 3 lotes pilotos.

#### 6.9.4.2 Resultados microbiológicos de la Envasadora de jarabes.

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de la envasadora de gotas evidencian un mayor crecimiento de bacterias en los puntos pc1 y pc2 (Ver figura 35), pero siguen estando dentro del límite permitido. El análisis estadístico de los resultados microbiológicos para el equipo la envasadora de jarabes no presenta diferencias significativas a nivel de microorganismo, ni a nivel de puntos de muestreo.

#### Recuento Microbiológico Envasadora de Jarabes

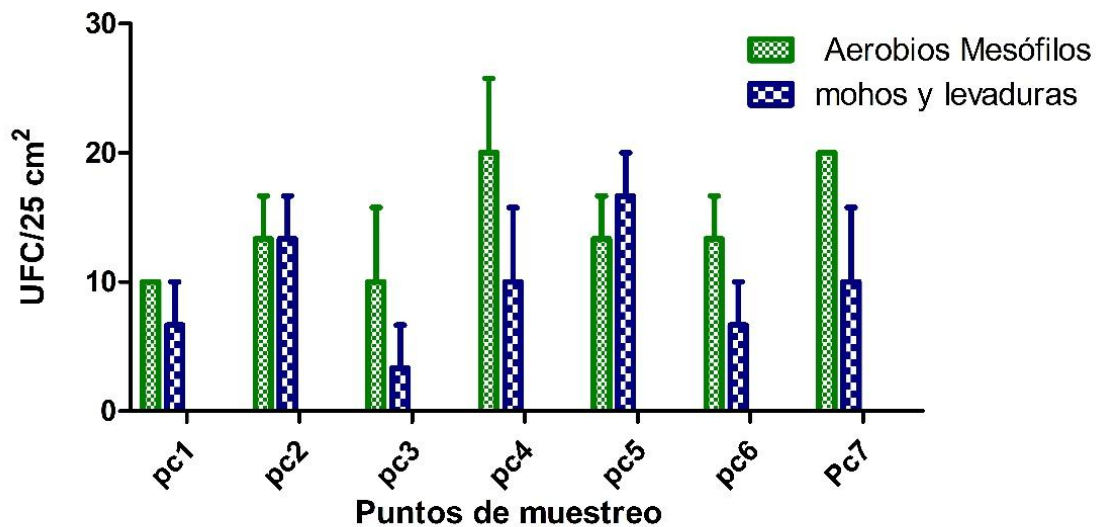


**Figura 35.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la envasadora de jarabes en 3 lotes pilotos.

#### 6.9.4.3 Resultados microbiológicos de la Dosificadora de cremas, Mezclador de polvos y Encapsuladora de cápsulas.

Los recuentos microbiológicos de la dosificadora de cremas, mezclador y encapsuladora no superaron el límite permitido de aerobios mesófilos y mohos y levaduras; en lo que corresponde al equipo dosificador crema sus mayores recuentos se presentaron en el punto pc4 y pc7 (Ver figura 36), para el mezclador los puntos más críticos fueron el pc2 y pc3 (Ver figura 37) a pesar de ser un equipo de poco diseño y de que solo presenta 3 puntos de muestreo. En el caso de la encapsuladora el punto que presentó mayor recuento fue el punto pc3 seguido del pc6 (Ver figura 38). A nivel general ninguno de los recuentos microbiológicos estos equipos superaron el límite permitido de UFC/25 cm<sup>2</sup>. Sin embargo se evidencia que en todos los recuentos microbianos el número de UFC de aerobios mesófilos es mayor en comparación con mohos y levaduras. Mediante el análisis estadístico se determinó que existen diferencias significativas en el caso de la dosificadora de cremas a nivel de tipos de microorganismo con un valor de 0,0335, pero no en los puntos de muestreo. En lo que respecta al equipo mezclador existen grandes diferencias a nivel de puntos y de tipo de microorganismos obteniéndose valores de 0,0091 y 0,0079 respectivamente y por último para la encapsuladora se establecieron diferencias a nivel de puntos y de tipo de microorganismos.

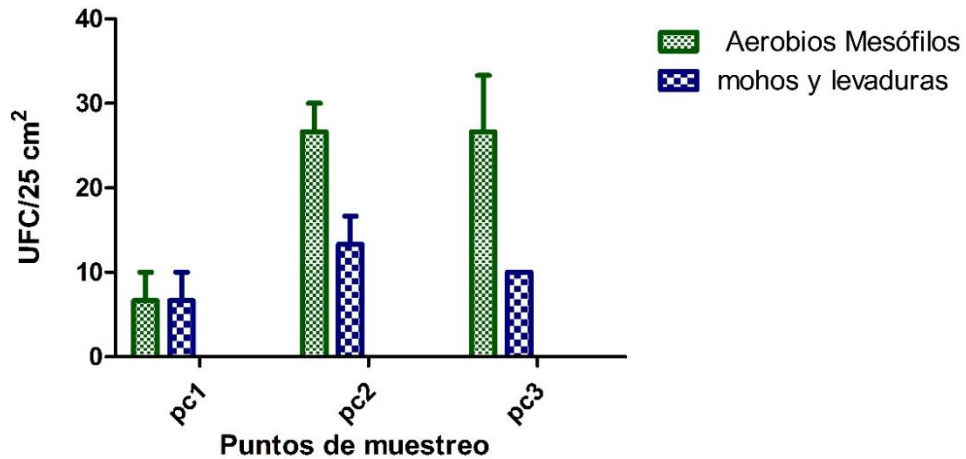
### Recuento Microbiológico de la Dosificadora de Cremas



**Figura 36.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la dosificadora de cremas en 3 lotes pilotos.

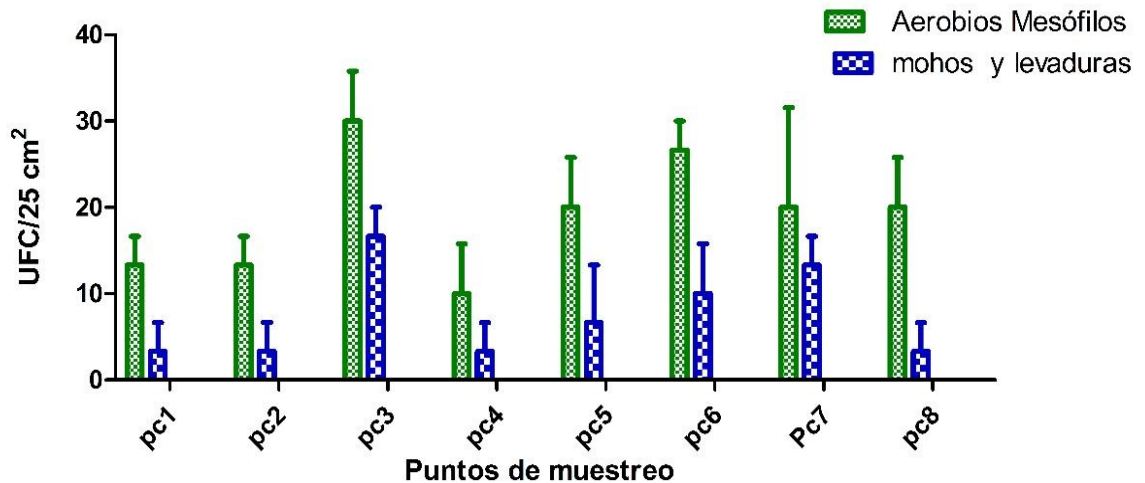


### Recuento Microbiológico de Mezclador



**Figura 37.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras del Mezclador de gotas en 3 lotes pilotos.

### Recuento Microbiológico Encapsuladora



**Figura 38.** Recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras de la encapsuladora en 3 lotes pilotos.

A nivel general se evidencio la ausencia total de microorganismos patogenos en este caso coliformes felaes, *E. coli* y *S. aureus* en todos los análisis microbiologicos de los puntos muestreados en cada uno de los equipos seleccionados con peores casos.

#### 6.9.5. Resultados microbiológicos de la evaluación de los utensilios.

La evaluación del proceso de LyD en los utensilios se realizó solamente teniendo en cuenta un parámetro en este caso el microbiológico (Ver tabla 25), debido a su minima complejidad; el utensilio canasta plástica se evaluó en los 3 lotes pilotos de Ajo cápsulas, para el caso de la pala plástica en los lotes de Azucena crema y para la caneca plástica en los lotes de Jarabe de caléndula.

**Tabla 25.** Recuentos Microbiológicos de los utensilios en 3 diferentes lotes pilotos cada uno.

UTENSILIOS	ESPECIFICACIÓN	CANASTA PLÁSTICA			PALA PLÁSTICA			CANECA PLÁSTICA			RESULTADOS
		Lote 001	Lote 002	Lote 003	Lote 001	Lote 002	Lote 003	Lote 001	Lote 002	Lote 003	
Aerobios Mesofilos	<50 UFC/25 cm <sup>2</sup>	<10	20	20	<10	<10	10	<10	10	<10	Cumple
Mohos y levaduras	<50 UFC/25 cm <sup>2</sup>	<10	<10	10	<10	10	<10	<10	<10	<10	Cumple
Coliformes Fecales	Ausencia	Ausencia									Cumple
<i>E. coli</i>	Ausencia	Ausencia									Cumple
<i>S. aureus</i>	Ausencia	Ausencia									Cumple

En los resultados obtenidos de los recuentos microbiológicos se observa que ninguno de los utensilios evaluados presentó recuentos mayores al establecido ni para aerobios mesófilos ni tampoco para mohos y levaduras, por otro lado al igual que en la evaluación de la LyD de los equipos se evidenció una ausencia total de los patógenos de ensayados en este caso.

### 6.9.6. Resultados microbiológicos de la estabilidad de del detergente y desinfectantes.

Durante el proceso de validación del proceso LyD las guías establecen que se debe realizar un seguimiento microbiológico o estudio de estabilidad a cada una de las sustancias utilizadas como detergentes y/o desinfectantes en los procesos de LyD, esto se debe realizar con cierta periodicidad para asegurar la efectividad de los mismos. En nuestro caso el análisis se realizó durante un mes. Los resultados microbiológicos (Ver tabla 26) permiten demostrar que las soluciones suministradas por los proveedores como las preparadas cada ocho días por el personal de producción presentan una ausencia total de los microorganismos ensayados en este trabajo durante el periodo evaluado, se hace necesario seguir realizando el análisis microbiológico a estas sustancias.

**Tabla 26.** Recuentos microbiológicos del detergente y los desinfectantes.

SUTANCIA	ANALISIS MICROBIOLÓGICO	ESPECIFICACIÓN	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	RESULTADO
Lauril Eter Sulfato de sodio al 27%	Aerobios mesofilos	0 UFC/mL	0 UFC/mL			Cumple
	Mohos y Levaduras					Cumple
Lauril Eter Sulfato al 1%	Aerobios mesófilos					Cumple
	Mohos y Levaduras					Cumple
Alcohol etílico al 96%	Aerobios mesófilos					Cumple
	Mohos y Levaduras					Cumple
Alcohol etílico al 70%	Aerobios mesofilos					Cumple
	Mohos y Levaduras					Cumple
Glutaraldehido al 2%	Aerobios mesófilos					Cumple
	Mohos y Levaduras					Cumple

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Teniendo en cuenta que la validación del proceso de limpieza y desinfección de equipos en la industria farmacéutica consta de 3 fases características las cuales se desarrollaron a plenitud en este trabajo. El cumplimiento de los requisitos mencionados en la Fase 1 aportó seguridad a todo el proceso pues son variables que pueden intervenir y afectar la efectividad de estos, es importante aclarar que estos prerequisites no solo se deben cumplir a cabalidad solamente durante el proceso de validación por el contrario su cumplimiento es de vital importancia para asegurar la calidad de los proceso de manufactura dentro de la planta de fitoterapéuticos LABFARVE.

Las característica que presenta la planta de fitoterapeuticos son las siguientes: tiene una intensidad de luz a nivel general de 459 luminex, el agua de uso diario se le tratamientos como lo son filtración, UV y por ultimo ósmosis inversa, el aire está establecido de 10 recambios por hora teniendo en cuenta que es de tipo D, con un tiempo de recuperación de 10 min, temperatura de 15 °C - 25 °C y una humedad relativa de 35% - 65%, las diferentes fuentes de aire comprimido presentan filtros HEPA de 5 µm. Todas estas condiciones aseguran las buenas prácticas de manufactura.

La Fase 2 permitió establecer los parámetros para diseñar los nuevos procesos LyD: se seleccionó el detergente LESS al 1%, el desinfectante Glutfar plus al 2%, el tiempo de contacto (10 min), los diferentes enjuagues a realizar, las acciones mecánicas, el secado de los equipos etc.

Los equipos que fueron seleccionados para la evaluación de los procesos corresponde a equipos no dedicados, esto hace que el riesgo de la contaminación cruzada sea mayor, complejidad que se tuvo en cuenta para el diseño de los nuevos procedimiento, el equipo que mayor diferencias presentó fue la encapsuladora esto puede ser soportado por la complejidad del diseño y la cantidad de puntos de contacto directo que tiene este equipo con el producto.

El análisis microbiológico es una parte esencial del programa de validación de limpieza. El recuento de los microorganismos permite conocer la

calidad microbiológica de las zonas de producción, y permite examinar el cumplimiento de las especificaciones reglamentadas. A pesar que el tiempo de exposición al desinfectante fue prolongado y de haber demostrado su actividad microbiana en la fase 2, se siguió observando crecimiento de la cepa nativa *Bacillus subtilis* en los análisis microbiológicos; esto se evidenció en los recuentos de aerobios mesófilos los cuales fueron mayores en comparación con los recuentos de mohos y levaduras en todos los equipos. Esto soporta la necesidad de realizar rotación de desinfectantes, debido a que los microorganismos tienen la capacidad de desarrollar resistencia a través del tiempo.

El INVIMA en su función de organismo regulador estableció actualmente que el método analítico de TOC que corresponde a un método no específico no puede ser utilizado como soporte durante el proceso de validación, en nuestro caso al tener el pleno conocimiento de la baja toxicidad de los productos seleccionados como peor caso y los demás que se fabrican, se considera poder demostrar que el método de CCD en el cual solo se pudo determinar una concentración de 27 ppm de rutina se pueda establecer como método analítico para la siguiente evaluación con los demás desinfectantes, aunque este no presente la sensibilidad para determinar el valor por defecto que corresponde a 10 ppm.

Realizando una comparación por equipos se obtuvo que existen diferencias significativas en los valores de pH de las aguas de enjuague solamente entre la envasadora de jarabe y el mezclador, la envasadora de jarabe y la encapsuladora, la envasadora de gotas y el mezclador, envasadora gotas y la encapsuladora y por último entre la dosificadora de cremas y encapsuladora (Anexo 5). Para el caso de los resultados de conductividad no se presentaron diferencias entre la envasadora de jarabe y envasadora de gotas, la envasadora de jarabe y dosificadora de cremas, el mezclador y encapsuladora; las demás combinaciones presentaron diferencias significativas (Ver Anexo 5). Respecto a los resultados de TOC no se presentaron diferencias significativas entre envasadora jarabes y envasadora de gotas, para los demás equipos en las diferentes combinaciones si se presentaron diferencias (Ver Anexo 5). Por último en lo que corresponde a los recuentos microbiológicos no se presentaron diferencias significativas entre los equipos ni para los recuentos de aerobios mesófilos ni para mohos y levaduras (Ver Anexo 5).

Concentraciones altas de materia orgánica sobre determinadas superficies provoca una mayor probabilidad de interferencia frente a la acción bactericida de un

desinfectante, promoviendo el crecimiento de los microorganismos y su adherencia a la superficie de estudio, en este caso acero inoxidable, espuma, teflón y plástico. Los mecanismos por los cuales la materia orgánica puede interferir con la actividad de los desinfectantes son la adsorción del desinfectante a coloides de proteínas, formación de complejos inertes poco activos y mediante la unión de los grupos activos del desinfectante. La inactivación del desinfectante y el fomento del crecimiento microbiano debido a la materia orgánica facilitan la formación de biofilms sobre las superficies (Wirtanen, 2003).

Es importante aclarar que para cada equipo se diseñó un procedimiento de LyD teniendo en cuenta el tipo de producto que se fabrica allí, pues en el caso de la encapsuladora corresponde al producto Ajo cápsulas producto que dentro de su formulación contiene carbono volátil sustancia que dificulta su limpieza. Para el caso de envasadora de cremas se fabrica el producto Azucena crema que dentro de su formulación presenta sustancias grasosas de difícil remoción.

La limpieza manual que se estableció en los procedimientos de LyD, sin duda alguna son una fuente de variabilidad, pues el ser humano es la mayor fuente de contaminación, pero también es cierto que cuando se ejecutan estos procedimientos de forma correcta, es decir teniendo en cuenta todo tipo de especificaciones se asegura que esta se ha efectiva. Para ello es de vital importancia la capacitación técnica y sobre todo el compromiso por parte del operario durante el proceso de limpieza.

La validación de los procedimientos de LyD en lotes pilotos no comerciales fue una actividad que permitió obtener resultados a escala real, pues los procedimientos fueron desafiados en la planta de fitoterapéuticos lo que permitió demostrar su efectividad.

## 8. CONCLUSIONES

La selección de los equipos de peores casos basados en la selección de los peores casos de productos, permitió desarrollar una validación menos extensa del proceso de limpieza y desinfección, pues realizar la validación en todos los equipos es desgastante y los costos de materiales y de recurso humano son sumamente elevados. La selección en este caso de los 5 equipos, envasadora de jarabes, envasadora de gotas, dosificadora de cremas, mezclador de polvos y encapsuladora de cápsulas conglomerada las peores situaciones de los casos de LyD, lo que quiere decir que si el proceso de LyD fue efectivo en estos casos lo será para los demás equipos.

Los límites aceptables de residuo calculados para los productos seleccionados como peores casos fueron superiores a 10 ppm, por ende se debieron adaptar al valor por defecto, el límite microbiológico se estableció internamente teniendo como referencia lo establecido por la USP siendo este de  $<50 \text{ UFC}/25\text{cm}^2$  y para los límites químicos se siguió lo establecido por la USP.

Los ensayos a escala de laboratorio que se desarrollaron durante la fase 2, permitieron establecer o determinar aspectos como lo fueron: el desinfectante a utilizar en los procedimientos, el tiempo de contacto, los tipos de limpieza mecánica y/o manual, el tipo de detergente entre otros. Todos estos aspectos fueron el soporte para el diseño de los procedimientos de limpieza y desinfección de los 5 equipos seleccionados.

Al realizarse la evaluación de los procedimientos de LyD de los equipos en los 3 lotes pilotos de cada uno de los productos seleccionados como peores casos: valeriana gotas, caléndula jarabe, azucena crema, gualanday polvo y ajo cápsulas. Se demostró la eficiencia de los procedimientos diseñados ya que los resultados obtenidos para los diferentes parámetros se encontraban dentro de los límites permitidos. Esto permite demostrar que al finalizar los procedimientos se obtienen equipos limpios, evitando cualquier riesgo por contaminación química, física o microbiológica en los productos fabricados.

## 9. RECOMENDACIONES

El personal encargado de las operaciones en la planta de fitoterapéuticos debe recibir capacitaciones continuas de acuerdo a la forma en la cual se debe realizar los procesos de limpieza y desinfección de los equipos, así como la preparación de los agentes de limpieza.

El área de lavado debe permanecer limpia y ordenada, lo que con lleva a que una vez se culmine cualquier actividad de rutina, se debe realizar la limpieza y desinfección de esta para evitar la acumulación de residuos de productos los cuales pueden propagar el crecimiento microbiano.

Si en dado caso se fabrica un nuevo producto se debe determinar su complejidad de remoción para así establecer el método de limpieza (concentración de los agentes de limpieza, temperatura, tiempo de exposición, uso de utensilios etc.); en este estudio se demostró que la dificultad de remoción de los productos no es igual en todas las ocasiones.

Se recomienda la opción de adicionar otros desinfectantes al proceso de limpieza y desinfección, de esta forma se evita el desarrollo de resistencia de los microorganismo debido a la rotación con que se aplican estos y a sus diversos efectos sobre los microorganismos.

Cada vez que se ingrese un equipo nuevo o en su defecto que ingrese después de haber estado en mantenimiento, este debe ser sometido a un proceso de limpieza y desinfección antes de ser ubicado en su respectiva área.

Los utensilios (paños de microfibra, churruscos, cepillos etc) que se utilizan para realizar la remoción en los procesos de limpieza y desinfección deben ser cambiados cada determinado tiempo, es todo con el fin asegurar que ejercerán la misma función en el proceso de limpieza y desinfección.



Se debe realizar a través del tiempo la verificación del proceso de limpieza y desinfección una vez haya sido establecido.

Queda por establecerse el tiempo limpio de los equipos aquí evaluados, debido a que altamente estos equipos están en constante funcionamiento, lo que dificulta la determinación de este parámetro.

El INVIMA establece dentro de su normatividad que en el proceso de Limpieza y Desinfección deben incluirse como mínimo 3 desinfectantes y dentro de los cuales debe haber uno de tipo esporicida. Teniendo en cuenta esto durante este trabajo solamente se evaluó un desinfectante en los 5 procedimientos de LyD, lo cual direcciona a realizar estudios posteriores que permitan la evaluación de por lo menos 2 desinfectantes más, para poder completar la validación de los LyD.

Si en dado caso los resultados microbiológicos de los análisis de superficie exceden el límite establecido por la normatividad, se debe realizar una revalidación del proceso de limpieza y desinfección estableciéndose nuevas condiciones en el proceso de limpieza y desinfección.

## 10. GLOSARIO

**Bactericida:** agente químico que provoca la destrucción y muerte de bacterias en unas condiciones definidas, pero no de esporas.

**Bacteriostático:** agente químico que inhibe el desarrollo y proliferación de bacterias en unas condiciones definidas.

**Detergente:** producto de limpieza contenido uno o más tensioactivos adicionados de álcalis o ácidos, secuestrantes, solubilizantes y otros activos.

**Equipo o instalación dedicada:** equipo destinado exclusivamente a la fabricación de un producto o familia de productos. También se denomina equipo especializado.

**Equipo o instalación polivalente:** equipo destinado a la fabricación de diferentes productos familia o familia de productos: También se denomina equipo no dedicado.

**Enjuagar:** aclarar con agua limpia lo que previamente se ha lavado o fregado.

**Fungicida:** Agente químico que provoca la destrucción y muerte de hongos y sus esporas en unas condiciones definidas.

**Lavado:** aplicación de soluciones limpiadoras sobre superficies por medios mecánicos o manuales para eliminar la suciedad.

**Limpieza:** operación de eliminar la suciedad (por partículas o física, química y microbiológica), mediante un procedimiento que combine, de forma variable los cuatro factores siguientes: acción mecánica, acción química, tiempo y temperatura.

**Limpio:** un equipo está limpio si está ausente de materiales que pueden contaminar o adulterar los productos fabricados a continuación hasta el punto de comprometer su adecuación al uso.

**Peor caso (worst case):** selección de las condiciones más desfavorables para demostrar el buen funcionamiento de un procedimiento de limpieza.

**Punto crítico:** puntos del equipo donde la presencia de residuos es especialmente peligrosa ya que puede originar una contaminación selectiva del producto fabricado posteriormente.

**Revalidación:** repetición del proceso de validación o de una parte determinada del mismo.

**Sistema de aspersion:** mediante este sistema, los agentes de limpieza se aplican en forma de ducha o spray alcanzando todas las partes a limpiar.

**Sistemas de inmersión:** los elementos a limpiar se sumergen a uno o varios baños que contienen las soluciones de limpieza.

## BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. AEMPS. Departamento de Inspección y Control de Medicamentos. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. PARTE II REQUISITOS BÁSICOS PARA SUSTANCIAS ACTIVAS USADAS COMO MATERIALES DE PARTIDA. Fecha de publicación en la web Aemps: 2014; pp. 33 de 51. [En línea] [https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/reqBasicosSustActiv/13\\_parte-II.pdf](https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/reqBasicosSustActiv/13_parte-II.pdf)

ANAISREIG. Los factores de la limpieza: El círculo de Sinner. DISARP, productos de limpieza e higiene. 2011 (Agosto); pp. 1. [En línea]: <http://blog-disarp.com/los-factores-de-la-limpieza-el-circulo-de-sinner/>. Citado en Octubre 21 de 2016.

AOAC. Official Methods of analysis of AOAC international. Association of Official Analytical Chemist 17 the edition. Vol.1. (2000); pp. 7-10. [En línea] <http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d4461334/Desinf2.pdf>.

Asociación Española De Farmacéutica De La Industria. AEFI. BARANGÉ J, BUHIGAS R, CASTRO M, MESTRES J, PUJOL M, SANS J, VICENTE LL, ANTÚNEZ S, GONZALEZ D, GRAU C, IBAÑEZ Y, LAGUNAS C, NIUBÓ F y OLIBER P. (Sección catalana) Validación de métodos de limpieza. Barcelona, Noviembre (1994); pp. 1-174.

BAILLY J. Thesé Doctoral. Strategie de Validation nettoyage en industrie chimique et pharmaceutique. Université Claude Bernard-Lyon. Faculté de pharmacie. Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques. Mayo (2004); pp.44-55.

BOMBLIES, L.; WEIB, C. and BECKMANN, G. Examination of Microbiological Quality of Pharmaceutical Raw Materials. Pharmeuropa Scientific notes. (2007); pp 1-7.

CARLBERG D. Clean room microbiology for non-microbiologist. CRC Press ISBN 10:0935184732. (1995); pp. 100-102.

CARO C. Validación de procesos no estériles. Industria farmacéutica Equipos, procesos y tecnología. ISSN 0213.5574, N 2, 1996 (Marzo/Abril); pp 59-65. Centro para el Control Estatal de la Calidad de Medicamentos.

CECMED Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulacion 5. Principios generales para la validación de los procesos en la industria farmacéutica. 1994. [En línea] <http://www.cecmed.cu/Does/RegFarm/DRA/BPPF/1992-2002/Reg/Reg 5-94.pdf>

CERRA H; FERNÁNDEZ, C; HORAK, C; LAGOMARSINO, M; TORNO, G; ZARANKIN, E. Manual De Microbiología Aplicada A Las Industrias Farmacéutica, Cosmética y De Productos Médicos ISBN 978-987-26716-3-1. Publicado y editado en Buenos Aires. ( 2013).

CGMPBLOG. Tiempo de permanencia de un equipo en estado limpio. Febrero (2012). [En línea] <http://blog.cgmpdoc.com/tag/validacion-de-limpieza/>

CUMPLIDO A. Limpieza de equipos, CIP Clean In Place, métodos de limpieza automáticos. Farmaespaña Industrial. Noviembre/Diciembre (2014); pp 52-54. [En línea] <http://www.edelflex.com/content/sistema-de-limpieza-cip-cleaning-place>.

CUBEN. Ingeniería y bioseguridad. Equipos de limpieza CIP, lavado de equipos y cañerías [En línea] [http://www.cuben.com.ar/catalogos/01\\_ARTICULO\\_TECNICO\\_CIP\\_CUBEN.pdf](http://www.cuben.com.ar/catalogos/01_ARTICULO_TECNICO_CIP_CUBEN.pdf). 2012. Citado en noviembre 09 de 2016.

European Medicines Agency. EMA. Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities. November (2014); pp. 5-11. [En línea] [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2014/11/WC500177735.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/11/WC500177735.pdf)

Farmacopea De Los Estados Unidos De América. USP. 37. NF 32. Volumen 1. Oficial desde el 7 de mayo de 2014.

Food and Drug Administration. Guide to Inspections of Validation of cleaning Processe. Division of Investigations. Office or Regional Operations. Office or Regulatory Affairs, Rockville, MD. July, 1993. [En Línea] [http://www.fda.gov/ora/inspect\\_ref/igs/valid.html](http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/igs/valid.html)

FORERO, R y PIEDRAHITA, D. Análisis y evaluación de los procesos de limpieza y manual de equipos de manufactura en una industria nutracéutica. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de microbiólogo

industrial. Pontificia Universidad Javeriana Carrera de Microbiología Industria Facultad de Ciencias. Fort Laurerlade. Julio. (2008); pp 33-38

FORSYTH R. Equipment-Holt Time for Cleaning Validation. Pharmaceutical Technology. 32(4). April. (2008); pp.1-5.

FUGATE T. Hold Time Studies: A Lost Parameter for Cleaning Validation. Journal of Validation Technology. 13, (2007); pp. 206-209.

Guía de inspección de buenas practices de manufactura para la industria de productos farmacéuticos (GMP). Instituto De Salud Pública De Chile Departamento Control Nacional Subdepartamento De Fiscalización. Julio. (2010); pp. 14 de 55.

Guía de Normas de Correcta Fabricación .NCF. Volumen 4. EU Guideline for Good Manufacturing Practice For Medicinals Prducts for Human and Veterinary Use. Annex 15: Qualification and Validation. 2015 (March).

Gorman SP, Scott EM, Russell AD. Antimicrobial activity uses and mechanism of action of glutaraldehyde. J Appl Bacteriol 1980; pp161-190

HOLDER. I. *Pseudomonas aeruginosa* virulence associated factors and their role in bum wound infections. In *Pseudomonas aeruginos: the Opportnist*. R.B Fick Jr. Ed. CRC, Press, Inc, Boca Raton, Fla.(1993); pp. 235-245.

ICH Q7. International conference on Harmonisation. Harminised tripartite guideline. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients. Current Step 4 version. [en line]. November. (2000); pp 28 de 43.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. INVIMA. Capacitación Validación de Limpieza y Desinfección de Equipos. 2016. Consultado el 5 de Octube de 2016. [En Línea] <https://www.invima.gov.co/images/pdf/nuestra-entidad/Gestion/gestion-talento-humano/capacitacion/CAPACITACION%202016/Plan%20de%20Capacitacion%202016.pdf>.

JENSKINS k, VANDERWIELE A. Cleaning Validatio: An Overall Perspective Pharmaceutical Technology. 18 (4). (1994); pp 60-73

KIM B. Cleaning Process Development and Validation [en línea]. VP of Quality. Tanox, Inc. june (2016).

KLUGER D, POCHARD, M, SCHLUSSER, V. Hygiene en industrie alimentaire. Henkel France SA. (1981); pp.116.

LABFARVE. Laboratorio de Farmacología Vegetal. 2016.

LEBLANC, D. Setting Acceptance Criteria, in validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing. Englewood: Interpharm Press. (2000); pp. 135-50.

LOPÉZ, M y PIERRE,. Establecimiento del límite aceptable para el residuo de limpieza en los equipos de producción de la industria farmacéutica. Instituto de materiales y reactivos. Universidad de la Habana Revista cubana Farm. (2005); pp 1.

Ministerio De La Protección Social. MPS. Resolución número 3028 de 2006 (13 de Agosto).

POMBO L, MATULEVICH J, BORREGO P, CASTRILLÓN W, Barajas L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Pelargonium odoratissimum* (L) L`Hér (Geraniaceae). Revista facultad de ciencias básicas. Universidad militar nueva granada. ISSN 1900-4699. Volumen 12. Número 1. (2016). pp 74-83. [En línea] <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1856>.

REZQUELLAH W. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica. Validación de los procesos de limpieza en la industria farmacéutica, mediante la aplicación de análisis de riesgo, seguridad toxicológica y UPLC. Universidad de Barcelona. 2015; pp. 74.

RIVERA E. Respuesta a los 5 asuntos más comunes sobre validación de limpieza en los equipos de fabricación farmacéutica. Seminario Steris. Buenos Aires. Argentina. Septiembre (2013). [En línea]<http://www.euroñabsa.com.ar/noticiassteris/SeminarSTERIS%28ArgentinaSept2013%29%29v.3.pdf>.

SALAZAR, R.; PUJOL, M.; BOYA, M. Libro de cualificación y validación, elementos básicos de la calidad y productividad industrial. Ramon Salazar Macian, (2007); pp 676-717.

SÁNCHEZ, L y SAENZ, E. Antisépticos y Desinfectantes. Dermatología Peruana Vol15 N.2. (2005); pp 87-89.

STAMATIS, Dh. Failure Mode and Effect Analysis: FMEA from Theory to Execution. Milwaukee, WI, ASQ Press, 1995; pp 45-76.

TAZÓN, F. ICH Q9 Quality Risk Management. Seminario del Instituto de formación continúa IL3. Universidad de Barcelona, Barcelona, Noviembre (2007).

WAGNER H y BLADT S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer. Second edition, Berlin 1996; pp. 384

WHITE, E y MOALLAH, A. Risk-Based Cleaning Validation in Biopharmaceutical API, Manufacturing, BioPharm International. November (2005).

WIRTANEN, G. Desinfection in food processing – efficacy testing of disinfectans. Reviews in Environmental Science and Bio/Tecnology. (2003); pp 293-306.

World Health Organization. WHO. Annex 2. Good manufacturing practices for active pharmaceutical ingredients [en línea]. WHO Technical Report Series, N. 957, 2010; pp 130-191. [En línea] <http://apps.who.int/prequal/infogeneral/documents/TRS957/TRS957Annex2GMP-API.pdf>.

World Health Organization. WHO. Buenas Prácticas De La OMS Para Laboratorios De Control De Calidad De Productos Farmacéuticos. Guía De Autoevaluación De BPL. Technical Report Series, No. 957, 44th Report. Annex 1. 2010.

World Health Organization. WHO. WHO EXPERT COMMITTEE ON PHARMACEUTICAL SPECIFICATIONS, Technical Report Series. 32 Report (1992); pp 84-114. [En línea]: [https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/informes/informe32delaOMS\\_completo.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/informes/informe32delaOMS_completo.pdf)

ZELLE O. Cleaning Validation and Residue Limits: A contribution to current discussions. Pharma Technol Eur. November (1993); pp 18-27.



## ANEXOS

### Anexo 1: Matriz de selección de productos.

	<b>MATRIZ DE SELECCIÓN PARA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA</b>	<b>Código: T048M20-02</b>
<b>Fecha:</b> 08/09/16	<b>Emitido por:</b> JEFATURA DE PRODUCCIÓN	<b>Página - 110 - de 7</b>

Para la selección de los productos que se desafiaron en la validación de limpieza de los equipos productivos, se tendrán en cuenta los parámetros de:

1. Frecuencia de fabricación de los lotes de cada producto.
2. La solubilidad en agua.
3. La toxicidad del producto teniendo en cuenta la vía de administración, por ejemplo oral o tópico y el reporte de reacciones adversas o toxicidad para la especie en la vía de administración especificada.
4. La facilidad de limpieza en una superficie lisa.

Para dichos parámetros se realiza la calificación en una escala de 1 a 3 en frecuencia, solubilidad y facilidad de limpieza y en escala de 1 a 4 para toxicidad, de acuerdo con los siguientes criterios:

En la tabla anexa se especifican los valores obtenidos para cada producto; como se puede observar los productos con mayor calificación en la línea de líquidos son Caléndula Solución Oral y Valeriana Solución Oral Gotas; en la línea de sólidos se seleccionó Ajo Desodorizado Cápsulas y Gualanday Polvo y en la línea de Semisólidos se seleccionó la Crema de Azucena.

FRECUENCIA	1 UN LOTE CADA 2 O MÁS MESES 2 UN LOTE CADA MES 3 DOS LOTES O MÁS CADA MES
SOLUBILIDAD	1 ALTA SOLUBILIDAD EN AGUA 2 MEDIANAMENTE SOLUBLE EN AGUA 3 BAJA SOLUBILIDAD EN AGUA
TOXICIDAD	USO TÓPICO 1 NO TÓXICO 2 ALERGIA / DERMATITIS  VÍA ORAL 3 REACCIÓN ADVERSA DE TOXICIDAD REPORTADAS 4 NO REACCIÓN ADVERSA REPORTADA
FACILIDAD DE LIMPIEZA MEDIOS ABRASIVOS ABRASIVOS	1 ENJUAGE FÁCIL SIN MEDIOS ABRASIVOS 2 SUSTANCIA QUE REQUIERE ENJUAGUES ADICIONALES CON 3 SUSTANCIAS UNTUOSAS DE DIFÍCIL ENJUAGUE Y REQUIERE MEDIOS

Fuente:

1. Barnes, J., Anderson, L., Phillipson, J.D. Fitoterapéuticos. Pharmaceutical Press. Tercera Edición, 2012.
2. DerMarderojian, A., The Review of Natural Products. Facts and comparisons Publishing Group. 2000.



**MATRIZ DE SELECCIÓN PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA**

Código: T049N2U-02

Fecha: 08 / 09 / 16

Emitido por:

CONTROL DE CALIDAD

Página: 2 de 7

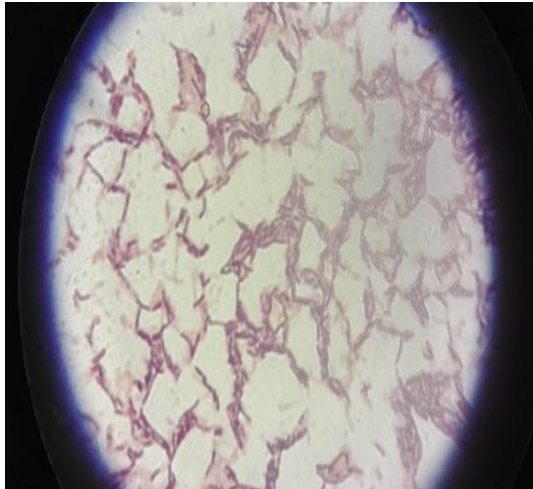
EXPEDIENTE	NOMBRE PRODUCTO	RESEÑA CÍ	REGISTRO SANITARIO	VENCE	PRINCIPIO ACTIVO	FRECUENCIA DE FABRICACIÓN	SOLUBILIDAD EN AGUA	TOXICIDAD	FACILIDAD DE LIMPIEZA	PODERADO
2063894	SOLUCIÓN ORAL DE CALENDULA	360 mL	PRH2014-000251	06/03/2024	Cada 100 mL contiene: Extracto de Flores de Calendula 0,2:1 16 mL	3	2	3	2	10
PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS GOTAS										
42615	VALERIANA SOLUCIÓN ORAL	60 mL	PFF2009-00011-R2	23/12/2019	Cada 1 mL contiene Extracto 0,2:1 en alcohol de 36% de hojas y flores deshidratadas y pulverizadas de Valeriana 1,0 mL	3	1	4	3	11
PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS CÁPSULAS										
1992925	AJO DESODORIZADO CÁPSULAS	60 U.	PRH2013-000059-R1	15/08/2023	Cada cápsula contiene: Bulbos de Ajo Deshidratados y Pulverizados 100 mg por cápsula	2	2	3	3	10
PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS POLVOS										
31378	GAUJANDAY POLVO	50 g	PRH2007-000001-R1	26/02/2008	Cada 100 g contiene Polvo de hojas de Gaubanday Deshidratadas 10g	2	2	1	3	8
95517	LEIVADURA CORMINATIVA	120 g	N-000177-R1	13/11/2009	Cada 100 g contiene: Levadura de Cerveza 16,66 g	1	2	3	1	7
PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS CREMAS										
31374	CREMA DE AZÚCAR	60 g	PRH2009-000032-R1	24/06/2009	Cada 100 g contiene: Extracto 1:1 de Azúcar en alcohol del 36% 10 mL	2	3	2	3	10

**Anexo 2.** Identificación de género y especie de la cepa nativa aislada.



**1**

**1.** crecimiento a las 24 horas de la cepa nativa en agar TSA y



**2**

**B.** Morfología cepa nativa bacilos Gram positivos objetivo 100x.

SEDE : CLINICA JUAN N CORPAS

No INGRESO: 20161129

Paciente: LEIDY BARAJAS

Edad: 2 Dias

Medico: Medico Juan N Corpas

Fecha Hora Ingreso: 2016-11-29 14:21

Servicio: URGENCIAS ADULTOS

No ORDEN: 201611297146

Historia: 20161129

Teléfono: 0

Fecha de impresion: 2016-12-01 08:51

Cama:

Examen

Intervalo Biológico de Referencia

MICROBIOLOGIA

CULTIVO PARA MICROORGANISMOS AEROBIOS

Resultado:

POSITIVO

Tipo de muestra: Muestra ambiental Labfarve

Microorganismo aislado: *Bacillus subtilis*

Informe final: Noviembre 30 de 2016

Bacteriologo: ELIANA ESPERANZA COQUE BURGOS Tlp: 63117377

BARAJAS LEIDY Orden: 201611297146

El Paciente se obliga a entregar estos resultados a su médico tratante y esto debe verificar que los anteriores fueron la totalidad de los exámenes solicitados por él y cubiertos por el plan de beneficios al que se encuentra afiliado el paciente.

Exámenes Procesados por Compensar

COPIA DEL INFORME


Resultado de identificación cepa nativa.

La cepa nativa fue identificada como a ***Bacillus subtilis***.

**Anexo 3.** Factor asignado para cada una de las características evaluadas en los equipos.

CÓDIGO	EQUIPO	PIEZAS DESMONTABLE <sub>x</sub> <sup>2</sup>	FACILIDAD DE LIMPIEZA <sub>x</sub> <sup>2</sup>	PUNTOS DE CONTACTO <sub>x</sub> <sup>3</sup>
1	Percolador	0,25	0,25	0,25
2	Dosificadora Gotas	0,75	1,5	1,5
3	Tanque de preparación	0,25	0,25	0,25
4	Dosificadora Jarabe	N/A	0,25	1,5
5	Marmita	0,25	0,75	0,25
6	Dosificadora cremas	1,5	1,5	1,5
7	Mezclador	0,25	1,5	0,25
8	Encapsulado ra	1,5	1,5	1,5
9	Balanza analítica	0,25	0,25	0,25
10	Tapadora de jarabes	0,25	0,75	0,25
11	Tapadora de gotas	0,25	0,75	0,25

**Anexo 4.** POES de limpieza y desinfección diseñados para los 5 equipos.

	<b>PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA ENCAPSULADORA CAP-8</b>	<b>Código:</b> I489011-02
<b>Fecha:</b> 02/11/16	<b>Emitido por:</b> JEFATURA DE PRODUCCIÓN	<b>Página</b> - 116 - de 129

**OBJETIVO:**

Establecer el procedimiento para la limpieza y desinfección de la encapsuladora CAP-8.

**ALCANCE:**

Este procedimiento aplica para la limpieza y desinfección de la encapsuladora CAP-8.

**RESPONSABILIDADES:**

Es responsabilidad del operario de fabricación llevar a cabo el presente procedimiento, es responsabilidad del Jefe de producción y de la asistente de producción divulgar y hacer cumplir el presente procedimiento. Es responsabilidad de Control de Calidad verificar el procedimiento de limpieza y desinfección.

**MATERIALES:**

1. Solución Lauril éter sulfato de sodio al 1%
2. Churruscos
3. Agua potable
4. Agua purificada
5. Paños de microfibra
6. Canecas plásticas de 100 L
7. Glutfar plus al 2%
8. Fuente de aire comprimido
9. Bolsa plástica (para cubrir)

**PROCEDIMIENTO:**

1. Retirar el producto terminado del área.
2. Desconectar el equipo de cualquier fuente de alimentación eléctrica.
3. Limpiar todo el equipo con un paño de microfibra seco.
4. Limpiar con aire comprimido hasta retirar todo residuo de producto.

**RETIRAR PARTES DESMONTABLES**

1. Aro de relleno.
2. Aro de alfileres.
3. Depósito de reciclaje.
4. Portador de aro.
5. Embudo o tolva de cápsulas.
6. Embudo o tolva de polvo.

- |  |   |
|--|---|
| 7. Unidad del alimentador.             | 8. Deslizador de cápsulas.              |
| 9. Canal.                              | 10. Aspa de empuje.                     |
| 11. Separadores de la placa de apoyo.  | 12. Tornillo sinfín (barrenador).       |
| 13. Mezclador.                         | 14. Tapa acrílica.                      |
| 15. Disco expulsor.                    | 16. Disco de seguridad del expulsor.    |
| 17. Disco giratorio del expulsor.      | 18. Unidad de rectificador.             |
| 19. Selladora de Cápsulas              | 20. Base del embudo o la tolva de polvo |
| 21. Disco pequeño superficie de equipo |   |

### **TRASLADO DE LAS PARTES DESMONTABLES SUCIAS AL AREA DE LAVADO**

1. Colocar las partes desmontables del equipo en las canecas plásticas de 100 L y trasladar al área de lavado.
2. Hacer un prelavado de las piezas del equipo con agua potable.
3. Aplicar la solución Lauril éter sulfato de sodio en una concentración del 1% y restregar todas las piezas con la ayuda del cepillo y churrusco haciendo énfasis en aquellos puntos que pueden acumular con facilidad cualquier tipo de residuo durante 5 minutos.
4. Enjuagar con abundante agua potable hasta retirar toda la solución Lauril éter sulfato de sodio al 1%.
5. Enjuagar las piezas con agua purificada.
6. Sumergir las piezas desmontables en 1 L de Glutar plus al 2% por 10 min. A la tolva de alimentación y a la tolva encarriladora aplicar por aspersión tolva.
7. Enjuagar las piezas con agua purificada.
8. Trasladar las piezas a la respectiva área y secarlas con aire comprimido.
9. Colocar las partes desmontables en una caneca plástica limpia y seca, taparlas e identificar

### **LIMPIEZA DE LA BASE DE LA ENCAPSULADORA**


1. Con un paño de microfibra humedecido con Solución Lauril éter sulfato de sodio al 1% aplicar a toda la base de la encapsuladora.
2. Retirar completamente la Solución Lauril éter sulfato de sodio al 1% con la ayuda de paños de microfibra humedecidos con agua potable.
3. Limpiar toda la base del equipo con un paño de microfibra humedecido con la solución Lauril éter sulfato de sodio a una concentración del 1% durante 5 minutos.
4. Limpiar toda la base con un paño de microfibra humedecido con agua potable.
5. Limpiar toda la base con un paño de microfibra humedecido con agua purificada.
6. Aplicar por aspersión Glutar plus al 2% y dejar actuar por 10 min.
7. Limpiar toda la base con un paño de microfibra humedecido con agua purificada.
8. Secar con aire comprimido la base del equipo.
9. Solicitar revisión a Control de Calidad para verificar el estado de limpieza.
10. El operario de turno debe armar el equipo colocándole las partes desmontables.
11. Cubrir el equipo con bolsa plástica.
12. Colocar formato de equipo limpio.

**NOTA: Cuando se haga el muestreo de las aguas de enjuague para el análisis de determinación de trazas en estudios de validación, se debe tener en cuenta que el muestreo de Control de Calidad se lleva a cabo después de la aplicación del desinfectante**




<b>Elaboró:</b> Dr. John F. Hernández	<b>Revisó:</b> Dr. Leidy Barajas V.	<b>Aprobó:</b> Dra. María Eugenia Ávila
<b>Firma:</b>	<b>Firma:</b>	<b>Firma:</b>
<b>Cargo:</b> Jefe de Producción	<b>Cargo:</b> Microbióloga	<b>Cargo:</b> Directora Técnica
<b>Fecha:</b> 28/09/16	<b>Fecha:</b> 28/09/16	<b>Fecha:</b> 28/09/16


Procedimiento de limpieza y desinfección de la envasadora de jarabes.

	<b>PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE ENVASADORA DE JARABES</b>	<b>Código:</b> I507011-02
<b>Fecha:</b> 02/11/16	<b>Emitido por:</b> JEFATURA DE PRODUCCIÓN	<b>Página</b> - 118 - de 129


Procedimiento de limpieza y desinfección de la dosificadora de cremas.

	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCION DE LA DOSIFICADORA DE CREMAS (SEMISÓLIDOS)</b>	<b>Código:</b> I494011-02
<b>Fecha:</b> 02/11/16	<b>Emitido por:</b> JEFATURA DE PRODUCCIÓN	<b>Página</b> - 118 - de 129

Procedimiento de limpieza y desinfección del mezclador de polvos

	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCION DEL MEZCLADOR DE POLVOS</b>	<b>Código:</b> I484011-02
<b>Fecha:</b> 02/11/16	<b>Emitido por:</b> JEFATURA DE PRODUCCIÓN	<b>Página</b> - 118 - de 129

Procedimiento de limpieza y desinfección de la Envasadora de gotas.

	<b>PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA ENVASADORA DE GOTAS</b>	<b>Código:</b> I526O11-02
<b>Fecha:</b> 02/11/16	<b>Emitido por:</b> JEFATURA DE PRODUCCIÓN	<b>Página</b> - 119 - de 129

**Anexo 5.**Resultados del tratamiento estadísticos de los valores de pH, conductividad, TOC y recuentos microbiológicos

**Análisis estadístico de pH en los 3 lotes de la Envasadora de Jarabes**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	0,2667	4,000	Yes	*	0.04750 to 0.4858
Lote 001 vs Lote 003	0,06667	1,000	No	ns	-0.1525 to 0.2858
Lote 002 vs Lote 003	-0,2000	3,000	No	ns	-0.4192 to 0.01916

**Análisis estadístico de pH en los 3 lotes de la Envasadora de Gota**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	0,06667	1,095	No	ns	-0.1334 to 0.2667
Lote 001 vs Lote 003	0,1333	2,191	No	ns	-0.06673 to 0.3334
Lote 002 vs Lote 003	0,06667	1,095	No	ns	-0.1334 to 0.2667

**Análisis estadístico de pH en los 3 lotes de la Dosificadora de cremas**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	0,03333	0,6124	No	ns	-0.1456 to 0.2123
Lote 001 vs Lote 003	0,03333	0,6124	No	ns	-0.1456 to 0.2123
Lote 002 vs Lote 003	0,0000	0,0000	No	ns	-0.1789 to 0.1789

**Análisis estadístico de pH en los 3 lotes del Mezclador**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	0,0000	0,0000	No	ns	-0.1550 to 0.1550
Lote 001 vs Lote 003	-0,1000	2,121	No	ns	-0.2550 to 0.05497
Lote 002 vs Lote 003	-0,1000	2,121	No	ns	-0.2550 to 0.05497

**Análisis estadístico de pH en los 3 lotes de la Encapsuladora.**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	0,1333	3,464	Yes	*	0.006800 to 0.2599
Lote 001 vs Lote 003	-0,1333	3,464	Yes	*	-0.2599 to -0.006800
Lote 002 vs Lote 003	-0,2667	6,928	Yes	**	-0.3932 to -0.1401

Análisis estadístico de Conductividad en los 3 lotes de la Envasadora de Jarabes

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-0,03333	0,5477	No	ns	-0.2334 to 0.1667
Lote 001 vs Lote 003	-0,06667	1,095	No	ns	-0.2667 to 0.1334
Lote 002 vs Lote 003	-0,03333	0,5477	No	ns	-0.2334 to 0.1667

Análisis estadístico de Conductividad en los 3 lotes de la Envasadora Gotas

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	0,0000	0,0000	No	ns	-0.1550 to 0.1550
Lote 001 vs Lote 003	0,1000	2,121	No	ns	-0.05497 to 0.2550
Lote 002 vs Lote 003	0,1000	2,121	No	ns	-0.05497 to 0.2550

Análisis estadístico de Conductividad en los 3 lotes de la Dosificadora de cremas

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-0,03333	0,4629	No	ns	-0.2701 to 0.2034
Lote 001 vs Lote 003	0,06667	0,9258	No	ns	-0.1701 to 0.3034
Lote 002 vs Lote 003	0,1000	1,389	No	ns	-0.1367 to 0.3367

Análisis estadístico de Conductividad en los 3 lotes del Mezclador

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-0,1333	1,732	No	ns	-0.3864 to 0.1197
Lote 001 vs Lote 003	-0,03333	0,4330	No	ns	-0.2864 to 0.2197
Lote 002 vs Lote 003	0,1000	1,299	No	ns	-0.1531 to 0.3531

Análisis estadístico de Conductividad en los 3 lotes de la Encapsuladora

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-0,06333	1,641	No	ns	-0.1902 to 0.06352
Lote 001 vs Lote 003	0,03667	0,9503	No	ns	-0.09018 to 0.1635
Lote 002 vs Lote 003	0,1000	2,592	No	ns	-0.02685 to 0.2268

Análisis estadístico de TOC en los 3 lotes de la Envasadora de Jarabes

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	5,333	0,6222	No	ns	-22.85 to 33.51
Lote 001 vs Lote 003	-1,333	0,1555	No	ns	-29.51 to 26.85
Lote 002 vs Lote 003	-6,667	0,7777	No	ns	-34.85 to 21.51

Análisis estadístico de TOC en los 3 lotes de la Envasadora de Gotas

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-1,000	0,1528	No	ns	-22.51 to 20.51
Lote 001 vs Lote 003	1,667	0,2547	No	ns	-19.84 to 23.18
Lote 002 vs Lote 003	2,667	0,4075	No	ns	-18.84 to 24.18

Análisis estadístico de TOC en los 3 lotes de la Dosificadora de Cremas

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-4,000	0,3288	No	ns	-43.99 to 35.99
Lote 001 vs Lote 003	-7,000	0,5754	No	ns	-46.99 to 32.99
Lote 002 vs Lote 003	-3,000	0,2466	No	ns	-42.99 to 36.99

Análisis estadístico de TOC en los 3 lotes de la Mezclador

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-2,333	0,2756	No	ns	-30.17 to 25.50
Lote 001 vs Lote 003	2,667	0,3149	No	ns	-25.17 to 30.50
Lote 002 vs Lote 003	5,000	0,5905	No	ns	-22.84 to 32.84

Análisis estadístico de TOC en los 3 lotes de la Encapsuladora.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Lote 001 vs Lote 002	-15,33	1,088	No	ns	-61.66 to 30.99
Lote 001 vs Lote 003	7,000	0,4967	No	ns	-39.33 to 53.33
Lote 002 vs Lote 003	22,33	1,585	No	ns	-23.99 to 68.66

ANOVA 2 vías recuentos de Aerobios Mesofilos y Hongos y Levaduras para el equipo Envasadora de Gotas.

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Puntos	ns	No
Microorganismos	*	Yes

ANOVA 2 vías recuentos de Aerobios Mesofilos y Hongos y Levaduras para el equipo Envasadora de Jarabe.

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Puntos	ns	No
Microorganismo	ns	No

ANOVA 2 vías recuentos de Aerobios Mesofilos y Hongos y Levaduras para el equipo Dosificador de cremas

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Puntos	ns	No
Microorganismos	*	Yes

ANOVA 2 vías recuentos de Aerobios Mesofilos y Hongos y Levaduras para el equipo Mezclador.

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Puntos	**	Yes
Microorganismo	**	Yes

ANOVA 2 vías recuentos de Aerobios Mesofilos y Hongos y Levaduras para el equipo Mezclador.

Source of Variation	P value summary	Significant?
Interaction	ns	No
Puntos	*	Yes
Microorganismos	***	Yes

Análisis estadístico de pH de todos los Equipos

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Caléndula J/ Envasadora J vs Valeriana G/ Envasadora G	0,02222	0,2863	No	ns	-0.2558 to 0.3002
Caléndula J/ Envasadora J vs Azucena C/Dosificadora C	0,2111	2,720	No	ns	-0.06687 to 0.4891
Caléndula J/ Envasadora J vs Gualanday P/ Mezclador	0,4222	5,440	Yes	**	0.1442 to 0.7002

Caléndula J/ Envasadora J vs Ajo C/Encapsuladora	0,5556	7,157	Yes	***	0.2776 to 0.8335
Valeriana G/ Envasadora G vs Azucena C/Dosificadora C	0,1889	2,434	No	ns	-0.08910 to 0.4669
Valeriana G/ Envasadora G vs Gualanday P/ Mezclador	0,4000	5,153	Yes	**	0.1220 to 0.6780
Valeriana G/ Envasadora G vs Ajo C/Encapsuladora	0,5333	6,871	Yes	***	0.2553 to 0.8113
Azucena C/Dosificadora C vs Gualanday P/ Mezclador	0,2111	2,720	No	ns	-0.06687 to 0.4891
Azucena C/Dosificadora C vs Ajo C/Encapsuladora	0,3444	4,438	Yes	*	0.06646 to 0.6224
Gualanday P/ Mezclador vs Ajo C/Encapsuladora	0,1333	1,718	No	ns	-0.1447 to 0.4113

### Análisis estadístico de conductividad de todos los Equipos

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Caléndula J/ Envasadora J vs Valeriana G/ Envasadora G	0,06667	1,521	No	ns	-0.09032 to 0.2237
Caléndula J/ Envasadora J vs Azucena C/Dosificadora C	-0,1556	3,549	No	ns	-0.3125 to 0.001433
Caléndula J/ Envasadora J vs Gualanday P/ Mezclador	-0,3556	8,111	Yes	***	-0.5125 to -0.1986
Caléndula J/ Envasadora J vs Ajo C/Encapsuladora	-0,4122	9,404	Yes	***	-0.5692 to -0.2552
Valeriana G/ Envasadora G vs Azucena C/Dosificadora C	-0,2222	5,070	Yes	**	-0.3792 to -0.06523
Valeriana G/ Envasadora G vs Gualanday P/ Mezclador	-0,4222	9,632	Yes	***	-0.5792 to -0.2652
Valeriana G/ Envasadora G vs Ajo C/Encapsuladora	-0,4789	10,92	Yes	***	-0.6359 to -0.3219
Azucena C/Dosificadora C vs Gualanday P/ Mezclador	-0,2000	4,563	Yes	*	-0.3570 to -0.04301
Azucena C/Dosificadora C vs Ajo C/Encapsuladora	-0,2567	5,855	Yes	**	-0.4137 to -0.09968
Gualanday P/ Mezclador vs Ajo C/Encapsuladora	-0,05667	1,293	No	ns	-0.2137 to 0.1003

### Análisis estadístico de TOC de todos los Equipos

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Caléndula J/ Envasadora J vs Valeriana G/ Envasadora G	-9,111	1,952	No	ns	-25.82 to 7.602
Caléndula J/ Envasadora J vs Azucena C/Dosificadora C	-69,33	14,86	Yes	***	-86.05 to -52.62
Caléndula J/ Envasadora J vs Gualanday P/ Mezclador	-122,6	26,26	Yes	***	-139.3 to -105.8
Caléndula J/ Envasadora J vs Ajo C/Encapsuladora	-160,1	34,31	Yes	***	-176.8 to -143.4

Valeriana G/ Envasadora G vs Azucena C/Dosificadora C	-60,22	12,90	Yes	***	-76.94 to -43.51
Valeriana G/ Envasadora G vs Gualanday P/ Mezclador	-113,4	24,31	Yes	***	-130.2 to -96.73
Valeriana G/ Envasadora G vs Ajo C/Encapsuladora	-151,0	32,36	Yes	***	-167.7 to -134.3
Azucena C/Dosificadora C vs Gualanday P/ Mezclador	-53,22	11,40	Yes	***	-69.94 to -36.51
Azucena C/Dosificadora C vs Ajo C/Encapsuladora	-90,78	19,45	Yes	***	-107.5 to -74.06
Gualanday P/ Mezclador vs Ajo C/Encapsuladora	-37,56	8,048	Yes	***	-54.27 to -20.84

ANOVA 1 vía recuentos de Aerobios Mesofilos para los 5 equipos evaluados

Bonferroni's Multiple Comparison Test	.Aerobios Mésofilos				Hongos y Levaduras		
	Mean Diff	t	Summary	95% CI of diff	Mean Diff.	t	95% CI of diff
Envasadora Gotas vs Envasadora Jarabe	1,310	0,3510	ns	-10.22 to 12.84	0,0000	0,0000	-6.443 to 6.443
Envasadora Gotas vs Dosificadora	-3,810	1,197	ns	-13.64 to 6.023	-4,762	2,259	-11.20 to 1.681
Envasadora Gotas vs Mezclador	-9,524	2,319	ns	-22.22 to 3.171	-5,238	1,925	-13.56 to 3.079
Envasadora Gotas vs Encapsuladora	-8,690	2,821	ns	-18.21 to 0.8304	-2,738	1,342	-8.976 to 3.500
Envasadora Jarabe vs Dosificadora	-5,120	1,372	ns	-16.65 to 6.411	-4,762	2,259	-11.20 to 1.681
Envasadora Jarabe vs Mezclador	-10,83	2,383	ns	-24.88 to 3.217	-5,238	1,925	-13.56 to 3.079
Envasadora Jarabe vs Encapsuladora	-10,00	2,743	ns	-21.27 to 1.265	-2,738	1,342	-8.976 to 3.500
Dosificadora vs Mezclador	-5,714	1,391	ns	-18.41 to 6.981	-0,4762	0,1750	-8.793 to 7.841
Dosificadora vs Encapsuladora	-4,880	1,584	ns	-14.40 to 4.640	2,024	0,9916	-4.214 to 8.262
Mezclador vs Encapsuladora	0,8333	0,2068	ns	-11.62 to 13.29	2,500	0,9365	-5.660 to 10.66

Significant? P < 0.05?



