

130  
230  
302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACION  
DEL CONTROL AMBIENTAL EN UNA PLANTA  
FARMACEUTICA EMPLEANDO  
DOS METODOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LUZ LISSET OBLEA OCAMPO

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## I N D I C E

<b>Capítulo I</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>pag</b>
1.1	Planteamiento del problema.....	1
1.2	Objetivo.....	3
1.3	Hipótesis.....	3
<b>Capítulo II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
2.1	Fundamentos del programa de monitoreo microbiológico ambiental.....	5
2.2	Definiciones del programa.....	7
2.3	Procedimientos de vigilancia.....	10
2.4	Niveles de alerta y acción.....	11
2.5	Pruebas microbiológicas para determinación del aire ambiental.....	11
2.6	Muestreador de aire volumétrico Biotest/RCS.....	14
2.6.1	Ventajas del examinador.....	15
2.6.2	Principio de operación.....	15
2.6.3	Características del volumen.....	15
2.6.4	Cuantificación de colonias.....	17
<b>Capítulo III</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1	Diagrama general.....	18
3.1.1	Diagrama específico ( Método A ).....	19
3.1.2	Diagrama específico ( Método B ).....	20
3.2	Material, reactivos y equipo .....	21
3.2.1	Material biológico.....	21
3.2.2	Material de laboratorio.....	21

	pag
3.2.3 Reactivos.....	21
3.2.4 Equipo.....	23
3.3 Metodología.....	23
3.3.1 Método A.....	24
3.3.2 Método B.....	32
3.4 Análisis estadístico.....	32
<b>Capítulo IV RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
4.1 Resultados.....	34
4.1.1 Resultados del método A.....	34
4.1.2 Resultados del método B.....	35
4.2 Discusión.....	46
<b>Capítulo V CONCLUSIONES</b>	
CONCLUSIONES.....	48
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>

## CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 Planteamiento del problema

Por décadas se ha encontrado que los microorganismos que están en el medio ambiente juegan un papel importante en la contaminación de productos farmacéuticos. Esta contaminación puede afectar las preparaciones farmacéuticas en muy diferentes formas.

Ciertos microorganismos lipolíticos, tales como los géneros Aspergillus y Cladosporium así como especies de los géneros Pseudomona y Serratia; pueden descomponer las emulsiones de aceite-agua y metabolizar los ácidos grasos y glicerina dando como resultado una acidificación y provocar un sabor y olor desagradable, así como una decoloración del producto. (1)

Los polisacáridos que se usan para aumentar la viscosidad de las preparaciones farmacéuticas, pueden ser despolarizados por muchas especies de microorganismos, causando cambios en la viscosidad. (1,2)

Las especies del género Pseudomona y Acinetobacter pueden degradar los conservadores. Algunas especies del género-- Cladosporium pueden hidrolizar el preservativo ---- o-metil-p-hidroxibenzoico, cuyo rendimiento es inefectivo. Las especies del género Pseudomona y Corynebacterium son capaces de degradar la atropina en las gotas oftálmicas. La hidrocortisona puede ser transformada por cientos de especies del género Pseudomona, Enterobacter y Cladosporium, perdiendo su potencialidad. (1) Por último, la biodegradación de -

ingredientes pueden encaminar la formación de lipopolisacáridos tóxicos, pirogénicos y alergénicos. (10) El personal que trabaja en las diferentes áreas de producción, no puede estar totalmente libre de microorganismos, por lo que es necesario seguir programas de sanitización para mantener asépticas las áreas de trabajo.

El 20% de la flora normal de la piel está localizada en los canales foliculares, que no pueden ser desinfectados por los procedimientos usuales; estos microorganismos son los responsables del reestablecimiento de la flora superficial de la piel después del tratamiento de desinfección de la misma. La epidermis de las personas constantemente desprende---- microorganismos al medio y conforme aumenta la actividad de las personas la liberación de microorganismos será mayor. (8) Además de la contaminación por microorganismos originada por el personal, los sistemas de aire acondicionado, la maquinaria y los materiales, contribuyen a la contaminación ambiental. (17) Con el fin de reducir las posibilidades de contaminación de los medicamentos que no pueden esterilizarse en su fase final, es necesario llevar a cabo un muestreo ambiental de rutina durante el proceso de manufactura para poder detectar una contaminación microbiana y establecer las medidas apropiadas para su control. El avalúo de los límites microbianos en el ambiente, durante la manipulación del principio activo del medicamento, es considerado uno de los puntos más importantes en el proceso de

control de calidad. Esto es aconsejable no sólo para determinar el número de unidades formadoras de colonias por metro cúbico- en el aire (UFC/r.<sup>3</sup>) sino para hacer también una identificación primaria de los grupos microbianos presentes. Es por eso que se debe considerar el emplear medios de cultivo adecuados en los que se desarrollen diferentes grupos de microorganismos y así especificar la contaminación microbiana en el ambiente de las diversas áreas de una planta farmacéutica y tomar las medidas necesarias para eliminar y/o disminuir las principales fuentes de contaminación. (1,5)

### 1.2 Objetivo

Evaluar la eficiencia de un método mecánico de muestreo ambiental, en comparación con el método convencional de exposición de cajas petri, en la determinación de la calidad microbiológica del aire ambiental en el área de producción de soluciones orales (jarabes) de una planta farmacéutica.

### 1.3 Hipótesis

#### Hipótesis Nula (H<sub>0</sub>)

La eficiencia de un método mecánico de muestreo ambiental -- ( A ), en comparación con la del método convencional de exposición de cajas petri ( B ), es la misma en la determinación de la calidad microbiológica del aire en una planta farmacéutica.



**Hipótesis Alternativa (Ha)**

La eficiencia de un método mecánico de muestreo ambiental-- ( A ), en comparación con la del método convencional de exposición de cajas petri ( B ), es mejor y más efectivo en la determinación de la calidad microbiológica del aire en una-- planta farmacéutica.

## C A P I T U L O    I I

## ANTECEDENTES

### 2.1 Fundamentos del programa de monitoreo microbiológico ambiental

Existen diversos contaminantes biológicos en el ambiente de las áreas de producción críticas y controladas (estériles y no estériles); entre los más frecuentes están: bacterias, hongos, virus y rickettsias. Su tamaño varía de 10 micras a varios milímetros. Siendo microorganismos vivos, se reproducen y sobreviven bajo diferentes condiciones y ambientes. Algunos secretan materiales mucilaginosos que los protegen de los desinfectantes y los ayuda a adherirse a los materiales, otros secretan sustancias tóxicas, crean formas de resistencia y soportan el agua a ebullición, sequedad, agentes químicos, etc. Con el fin de mantener la calidad del producto, el ambiente inmediato al lugar donde se realizan las operaciones debe ser de óptima calidad. Por eso es necesario conducir un programa rutinario de monitoreo microbiológico ambiental, para controlar el grado de contaminación en el ambiente. (6)

El aire debe tener una alta calidad microbiana. En el primer tipo de área conocida como crítica, los productos, recipientes y dispositivos de cierre esterilizados, están expuestos al medio ambiente. Las actividades que se desarrollan en la misma incluyen proceso de los productos esterilizados antes y durante las operaciones de envasado y sellado. El aire en esta área debe tener una alta calidad microbiana. Una incidencia no mayor a  $1 \text{ UFC/m}^3$  se considera aconsejable. (5,6,11)

En la segunda área de estudio conocida con el nombre de controlada, es importante vigilar el ambiente en donde se prepara el producto no esterilizado, los materiales en proceso, el recipiente con su dispositivo de cierre y las áreas donde se mezclan los componentes que se exponen al ambiente de la planta farmacéutica. (5,6,11)

Este ambiente debe tener una alta calidad microbiana y de partículas. El aire de las áreas controladas es aceptable si tiene un conteo de partículas por metro cúbico no mayor de 100,000, el tamaño puede ser mayor o igual a 0.5 micras en cuanto a la calidad microbiana, se acepta una incidencia no mayor de 50 UFC por metro cúbico. (5,6,11)

El programa de control microbiológico debe considerar los siguientes puntos:

- a) Un diseño fácil y completo del programa de mantenimiento
- b) Existencia de sistemas que documenten el programa
- c) Validación de los procedimientos de descontaminación
- d) Uso de procedimientos de control confiables
- e) Prácticas adecuadas de manufactura
- f) Existencia de áreas afectivas con acceso a los controles
- g) Adiestramiento del personal que participe en el programa
- h) Control de calidad en equipos y materiales.

Las áreas involucradas en el programa, deben brindar apoyo a los puntos anteriores. (7)

La vigilancia microbiológica es un método utilizado para evaluar la efectividad de los controles en el ambiente de manufactura, por lo que un programa orientado a la evaluación del ambiente microbiológico con procedimientos fáciles,--- auxilia a los programas de esterilización para productos terminados tales como; inyectables y productos no estériles entre los que se encuentran; soluciones, tabletas, encapsulados, supositorios, etc.

El programa de monitoreo microbiológico ambiental, debe incluir; sistemas de control, aire, materiales y equipo a utilizar, personal y agua. (7)

## 2.2 Definiciones del programa

Las definiciones más importantes del programa son las siguientes: (7,12)

a) Niveles de alerta : Cuando los niveles de calidad microbiana exceden ligeramente, los parámetros ambientales establecidos, son señal de que las condiciones de operación rebasan potencialmente los límites, sin embargo esto no implica llevar a cabo una acción correctiva, pero obliga a realizar un monitoreo más cerrado que el estándar.

b) Niveles de acción : Cuando los niveles de calidad microbiana exceden los parámetros ambientales, son señal de que las condiciones de operación rebasan los límites establecidos y se requiere de acción inmediata. (ver tabla 1)

Los niveles de alerta y acción son usualmente obtenidos a ---

**TABLA 1: ACCIONES CORRECTIVAS A SEGUIR EN DIFERENTES SISTEMAS QUE PUEDEN ACTUAR COMO FUENTE DE CONTAMINACION MICROBIANA**

Sistemas	Investigación sobre posibles acciones correctivas
a) Aire comprimido (estéril sobre presión del aire)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetir la prueba inmediatamente</li> <li>• Realizar tinción de gram a las colonias microbianas</li> <li>• Sustituir el filtro de aire cuando ha sido confirmado el reanálisis</li> <li>• Revisar los datos recientes de los mismos sitios y los subsecuentes resultados de monitoreo aprovechables</li> </ul>
b) Superficies (áreas de llenado)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buscar el posible origen</li> <li>• Evaluar las prácticas de descontaminación</li> <li>• Checar en forma discontinua durante los procesos de manufactura</li> <li>• Examinar las áreas durante su empleo</li> <li>• Determinar si los controles estan evaluados</li> <li>• Revisar el riesgo del contacto con el producto</li> <li>• Determinar la sensibilidad de aislamiento de desinfectante cuando es usado</li> <li>• Checar si los microorganismos son los mismos en las diferentes pruebas</li> </ul>
c) Aire ambiental de las diferentes áreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revisar el nivel de actividad del personal</li> <li>• Inspeccionar el aire que proviene de los filtros</li> <li>• Revisar los procedimientos de sanitización</li> <li>• Checar las áreas de diferentes presiones</li> <li>• Revisar el riesgo del producto</li> <li>•</li> </ul>
d) Personal (impresiones digitales del operador de los procesos de esterilización)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revisar los datos de las pruebas de esterilidad</li> <li>• Identificar los diferentes tipos de colonias microbianas</li> <li>• Evaluar el entrenamiento del operador</li> </ul>
e) Agua (agua destilada y recirculación)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Examinar los datos de las pruebas de endotoxinas en el sistema de agua</li> <li>• Checar los procedimientos de sanitización</li> <li>• Inspeccionar los sistemas preventivos</li> </ul>

FUENTE: Tomado del reporte anual de la Asociación Farmacéutica Americana 1990.

través de los datos estadísticos.

c) Procesos de manufactura : Las medidas de las operaciones de manufactura incluyen el manejo y examen de materiales, procesamiento de los productos, formulación y fabricación, llenado de productos y empaque ó acondicionamiento.

d) Parámetros de control de los procesos : Estas medidas y condiciones están asociadas con los procesos de manufactura, los cuales tienen un potencial de impacto sobre la identidad, validez, calidad y pureza del producto. Ejemplos de éstos parámetros de interés son los procesos de desagüe, peso, volúmenes, temperatura y presión.

e) Parámetros de controles ambientales : Estas medidas y condiciones están asociadas con la facilidad y equipo empleado durante el proceso de manufactura ya que tienen un impacto potencial en la identidad, validez y calidad del producto. Entre los parámetros importantes está el flujo de aire, presiones, materiales, corrientes de aire del personal, temperatura, humedad relativa y el cargamento de sustancias con partículas viables y no viables.

f) Envasado aséptico : Es un proceso a través del cual el medicamento es esterilizado separadamente y empacado usando contenedores estériles y cerrados en un ambiente aséptico.

(7, 12)

### 2.3 Procedimientos de vigilancia

Para realizar los procedimientos de vigilancia se pueden obtener datos importantes en las prácticas adecuadas de manufactura. El personal que supervise el programa ambiental debe ser competente en la disciplina científica y tener autoridad así como un entrenamiento apropiado, en lo que respecta al equipo que se use durante las pruebas, debe estar calibrado y previamente preparado, así mismo los procedimientos a realizar deberán estar por escrito y ser seguidos. Los niveles de alerta y acción estarán basados en las áreas individuales de examinación, no obstante, sólo una puede elegirse como específica para permitir el mayor número de muestreos en una área/sistema para un muestreo periódico. El establecimiento apropiado de los niveles de acción o alerta y los sistemas para monitoreo. (7,12)

Para ejecutar el programa microbiológico ambiental, debe estar documentado el sistema en el lugar a examinar, mismo que se encuentra en condiciones fuera de control, paralelamente deben verificarse los mecanismos de alimentación con la finalidad de tomar una decisión exacta. Es importante destacar que una zona que se encuentra fuera de control, requiere de una investigación para determinar las causas de lo que está pasando y que se debe hacer para resolver la deficiencia. (5,7)

Para que exista consistencia en el tratamiento de los niveles de alerta y acción, es indispensable que se efectúe una investigación lógica que origine medidas correctivas, además --



todos éstos pasos deben estar preescritos, como se muestra en la tabla I.

Las metodologías seguidas durante las pruebas de muestreo son parte importante en los programas ambientales, cada método seleccionado como procedimiento de rutina debe ser validado, la razón para ello es que los procedimientos son caminos de control sobre los niveles de contaminación.

#### **2.4 Niveles de alerta y acción**

Los diferentes niveles de alerta y acción están basados en distintas publicaciones y se presentan en la tabla 2.

Cada industria puede establecer sus niveles de alerta y acción en caso de utilizar la metodología microbiológica tradicional la cual está basada en los principios de la microbiología. (7)

#### **2.5 Pruebas microbiológicas para determinación del aire ambiental**

Los contaminantes microbianos ambientales aparecen en partículas sólidas o líquidas, dichas partículas están constituidas en células individuales, una característica importante en los microorganismos es que pueden adherirse a las partículas del polvo ó estar suspendidos en el aire. (1)

La determinación total de partículas debe emplearse para efectuar el monitoreo de la calidad ambiental del aire durante el proceso de manufactura de medicamentos, lo anterior en virtud de que es viable la contaminación del aire, lo cual debe ser tomado en cuenta. (20)

**Tabla 2: Niveles de alerta y acción para diferentes sistemas que pueden actuar como fuentes de infección**

<u>Sistema</u>	<u>Nivel de alerta ó acción</u>	<u>Documento de referencia</u>
• Aire ambiental en áreas de producción	• 0.1 UFC viable por metro cúbico	• NASA 5340.2 212.222 propuesto LVP GMP
• Aire comprimido	• 0.1 UFC viable por metro cúbico en los puntos de uso	• NASA 5340.2 212.222 propuesto LVP GMP
• Agua para inyectables	• 30 UFC/ml	• USP XXI
• Agua para inyectables	• 10 UFC/100 ml	• 212.225 proposición LVP GMP regulaciones

FUENTE: Tomado del reporte anual de la Asociación Farmacéutica Americana 1990.

El propósito de realizar el monitoreo ambiental en la producción de medicamentos, tiene los siguientes objetivos:

a) Facilitar la determinación de los contaminantes que pueden estar sobre las superficies, b) La forma en que se lleva a cabo el trabajo y c) El posible mal funcionamiento de los sistemas de aire.

Existen varios métodos para determinar el nivel de contaminación ambiental, entre ellos se encuentran el de impactación sobre superficies sólidas, incidencia de líquidos, filtración, sedimentación, centrifugación, precipitación--- electrostática y térmica. (6,7,11,12)

La técnica más común es la de sedimentación. Esta se lleva a cabo por medio de la exposición en algunos lugares estratégicos y durante un tiempo determinado, de un número de cajas petri, conteniendo medios de cultivo. Después se incuban, las cajas y las colonias son contadas y los resultados son reportados como colonias por caja por hora. Este método genera solamente un índice cualitativo de los microorganismos suspendidos en el ambiente. (17)

La prueba puede ser más significativa, empleando la técnica mecánica de impactación sobre superficies sólidas. Este método utiliza un aparato que muestra una cantidad previamente conocida de aire durante un período de tiempo. Los resultados pueden ser reportados como el número de microorganismos en el ambiente por metro cúbico, éste método proporciona índices cuantitativos de contaminación ambiental. (6,7,14,17)

Idealmente la captación de microorganismos que se encuentran en el ambiente utilizando cualquier método debería ser 100%, sin embargo, no se conoce un método en que se pueda obtener ese resultado, la razón para ello está fundamentada en la pérdida de viabilidad de análisis de los métodos. (16)

#### 2.6 Muestreador de aire volumétrico Biotest/RCS

El examinador de aire Biotest/RCS, es un aparato portátil que sirve para realizar la estimación del número de colonias formadoras por unidad de metro cúbico en un área determinada. El aparato permite un examen periódico de la calidad del aire ambiental y los niveles de desarrollo microbiano dando información necesaria para realizar programas de desinfección, sistemas para tratamiento de aire y otros métodos de control ambiental. Las características del aparato, se pueden observar en la figura 1: (15)



Figura 1. Muestreador de aire volumétrico Biotest/RCS

Es importante el empleo del muestreador dentro de los laboratorios en las operaciones de fabricación de productos farmacéuticos, lo anterior facilitará la vigilancia sobre la efectividad de los filtros de control ambiental en las zonas estériles y no estériles. (15)

#### **2.6.1 Ventajas del examinador**

El examinador pesa solamente 1.5 kg., por lo cual es portátil, emplea cuatro baterías D para su funcionamiento. La velocidad con la que aspira es de un volumen de 40 litros/minuto y el intervalo de duración es de 30 segundos a 8 minutos. (15)

#### **2.6.2 Principio de operación**

Trabaja a través del principio de impacto, la función del examinador es coleccionar microorganismos ambientales cuantitativamente y sembrarlos en un medio de cultivo, la muestra de aire es enviada dentro del sistema a una distancia al menos de 40 cm. por medio del impulsor. Esta acción se puede observar en la figura 2 (15)

#### **2.6.3 Características del volumen**

Debido a su principio de operación y las propiedades geométricas del cilindro centrífugo el muestreador tiene una determinada capacidad en sus volúmenes de muestra. Por lo tanto es necesario distinguir entre el volumen total de la muestra y el volumen relevante para la separación de las partículas (volumen de separación).

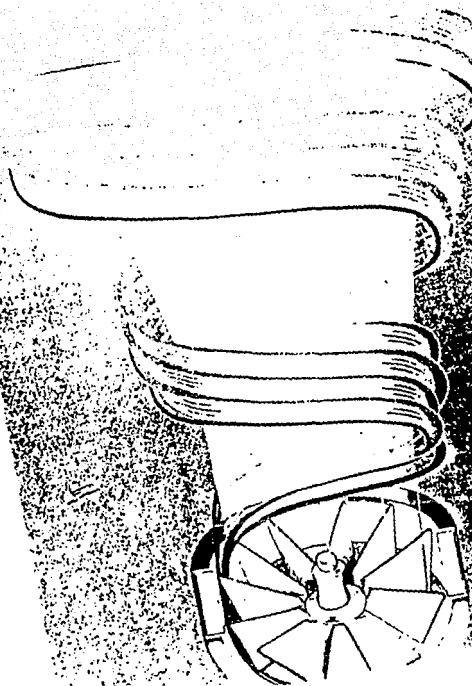


Figura 2. Mecanismo para coleccionar microorganismos

El volumen de separación por unidad de tiempo constituye la base para el cálculo del número de organismos por volumen de aire. (15)

#### 2.6.4 Cuantificación de colonias

La cuantificación de colonias se determina a través del cálculo de UFC/m<sup>3</sup>, UFC/l, UFC/ft<sup>3</sup>, de acuerdo a los datos que se requieran, se emplean las siguientes fórmulas:

$$1.- \text{ UFC/m}^3 = \frac{\text{colonias sobre el agar} \times 25}{\text{tiempo de muestreo}}$$

$$2.- \text{ UFC/l} = \frac{\text{colonias sobre el agar}}{40 \times \text{tiempo de muestreo}}$$

$$3.- \text{ UFC/ft}^3 = \frac{\text{colonias sobre el agar} \times 0.708}{\text{tiempo de muestreo}}$$

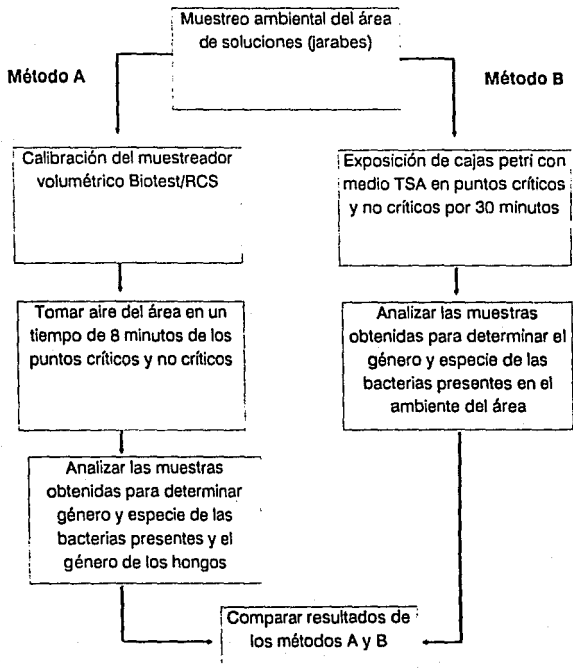
UFC = Unidad formadora de colonias

CAPITULO III

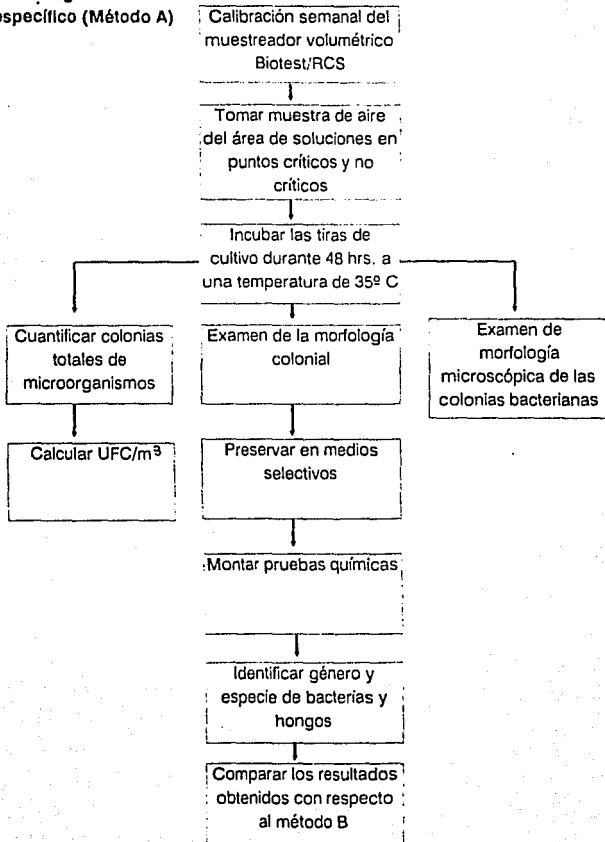


## PARTE EXPERIMENTAL

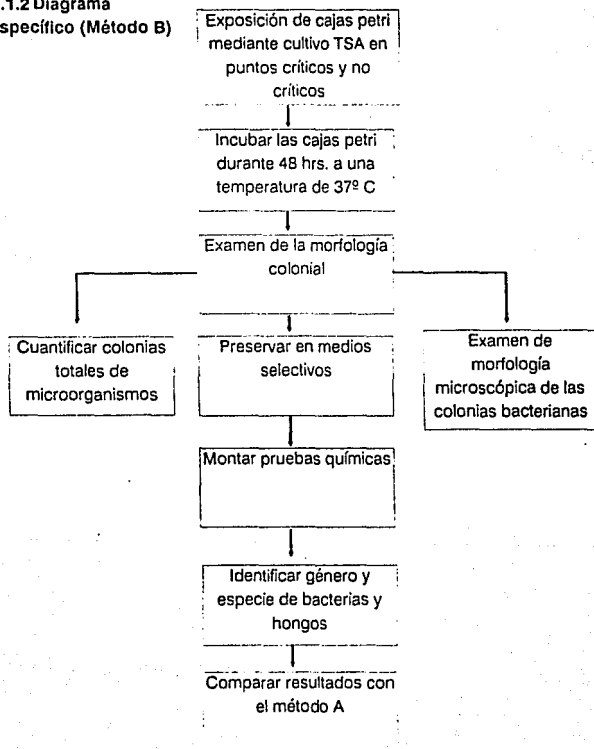
### 3.1 Diagrama General



### 3.1.1 Diagrama específico (Método A)



### 3.1.2 Diagrama específico (Método B)



### 3.2 Material, reactivos y equipos

#### 3.2.1 Material biológico

- Cepas control de la Secretaría de Salubridad y Asistencia  
[ E. coli ATCC-25516 ] [ P. aeruginosa ATCC-25619 ]

#### 3.2.2 Material de laboratorio

- Cajas Petri 100 x 15 mm (pyrex)
- Matraces Erlenmeyer 250 ml (pyrex)
- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 20 x 10 mm (pyrex)
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Probetas graduadas de 10, 100. y 500 ml (pyrex)
- Termómetro ( 10°C a 250°C )

#### 3.2.3 Reactivos

- Equipo de tinción de Gram ( S.S.A.)
- Alfa - Naftol (MERCK)
- Reactivo de Kovac's (Técnica química)
- Cloruro de sodio 6.5% (J.T.Baker)
- Hidróxido de potasio 40% (J.T.Baker)
- Plasma comercial ( B.B.L.)
- Peróxido de hidrógeno 30% (J.T.Baker)
- Reactivo rojo de metilo 0.1/500 ml (Técnica química)
- Discos de Novobiocina (Difco)
- Reactivo azul de metileno (Técnica química)

Nota: todos son de pureza de grado Reactivo.

**Medios de cultivo**

- agar base sangre (Bioxon)
- agar Mc.Conkey (Bioxon)
- agar para Estafilococos no. 110 (Bioxon)
- agar urea de Christensen (Bioxon)
- agar citrato de Simmons (Bioxon)
- agar cisteína-tripticasea (Bioxon)
- agar SIM - agar soya de tripticaseina (Bioxon)
- agar de hierro de Klieger - agar manitol (Bioxon)
- agar gelatina nutritiva (Bioxon)
- agar rojo de metilo (Bioxon)
- agar Voges-Proskauer (Bioxon)
- agar triple azúcar (Bioxon)
- agar lisina-hierro (Bioxon)
- agar Indol Nitrito (Bioxon)
- agar nutritivo (Bioxon)
- caldo FK (DIFCO)
- tiras de agar GK - A cuya superficie de área es de 34 cm<sup>2</sup>
- agar Eosina azul de metileno (Bioxon)
- agar cetrimida (Bioxon)
- Medio básico OF (BBL)
- Base de carboxilasa de Möller (Difco)
- agar sal manitol (Merck)
- agar dextrosa Sabouraud (Bioxon)

### 3.2.4 Equipo

- Muestreador volumétrico de aire BIOTEST/RCS portátil, que ayudará a la estimación del número de unidades formadoras de colonias por metro cúbico.
- Microscopio óptico (Weiss/GERMANY)
- Incubadora (LAB-LINE IMPERIAL II)
- Autoclave (COLE-PARMER)
- Tacómetro (COLE-PARMER)
- Estufa (COLE-PARMER)

### 3.3 Metodología

Para llevar a cabo este estudio comparativo se emplearon dos métodos simultáneos con el fin de comprobar las hipótesis planteadas.

El trabajo fué realizado en los Laboratorios Hormona S.A de C.V., para efectuar el estudio comparativo entre dos métodos se hizo una selección de áreas productivas, siendo elegida el área de jarabes, ya que por su alta producción, tiene diversos problemas de índole ambiental que repercuten en el producto final.

La parte experimental, se realizó durante un período de dos meses, las tomas de muestras se hicieron diario a la misma hora, misma que fué establecida de acuerdo a los intereses del laboratorio y en base a las características del área de soluciones orales (jarabes), se consideraron dos zonas, la llamada de puntos críticos que esta integrada por los tanques de almacenamiento, marmitas y la llenadora; y la zona de los --

puntos no críticos misma que esta compuesta por la mesa de trabajo, piso, área de acondicionamiento, mesa de acondicionamiento, almacén de materia prima y almacén de producto terminado. (ver figura 4).

Para realizar el control ambiental del área de soluciones orales (jarabes), se utilizaron dos métodos diferentes, los cuales son mencionados a continuación:

El método A, mismo que está estructurado en tres partes;

- 1.- Verificación semanal del muestreador volumétrico BIOTEST/RCS para corroborar su buen funcionamiento,
- 2.- Un sistema de muestreo
- 3.- El análisis microbiológico de las muestras.

El método B está constituido en dos partes:

- 1.- Un sistema de muestreo
- 2.- El análisis microbiológico de las muestras.

### 3.3.1 Método A

- 1.- Verificación semanal del muestreador volumétrico de aire RCS/BIOTEST.

#### Calibración

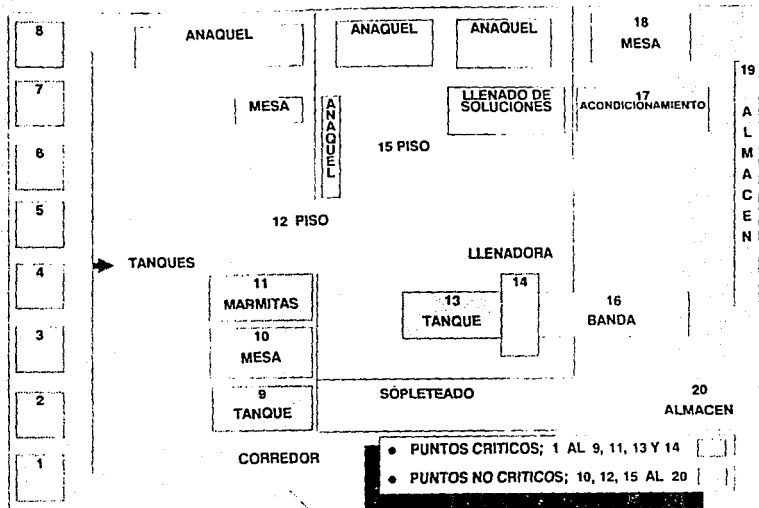
- aparato Biotest/RCS
- tacómetro
- cepas control de

Secretaría de Salubridad [ P. aeruginosa ATCC-25619 ]

y Asistencia [ E. coli ATCC-25516 ]

- tiras bacteriológicas GK-A/Biotest/RCS

**FIGURA 4: CROQUIS DEL AREA DE SOLUCIONES ORALES (JARABES), LABORATORIOS HORMONA S.A. DE C.V.**





### Procedimiento

La velocidad del rotor del muestreador volumétrico debe ser medido regularmente empleando un tacómetro; y las alas de hélice deben ser checados.

Para realizar la calibración del muestreador volumétrico verificar dos partes importantes del aparato para su buen funcionamiento, las cuales son: a) La velocidad del rotor y b) Las pendientes de las hélices del rotor.

a) Medir la velocidad del rotor cada vez que se emplea, para ello utilizar el tacómetro y realizar 5 mediciones, las cuales deben encontrarse dentro del valor recomendable, que es de  $4096 \pm 2\%$  rpm.

b) Verificar la pendiente de las hélices del rotor. Cuando se fabrica el muestreador de aire Biotest/RCS, las aspas del abanico están ajustadas en el ángulo correcto, con el uso el --- ángulo puede cambiar ligeramente, entonces es necesario corregirlo mediante el equipo calibrador. (Ver figura 5)

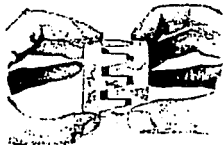


Figura 5. Equipo calibrador de aspas del muestreador volumétrico Biotest/RCS.

Para verificar el buen funcionamiento del aparato, realizar pruebas preeliminares con cepas control, llevar a cabo lo anterior usando tiras bacteriológicas GK-A en el aparato, --

efectuar la prueba en la campana de flujo laminar en la cual exponer cajas petri conteniendo diferentes cepas control, posteriormente, muestrear el ambiente alrededor de las cajas petri durante 8 minutos.

Incubar las tiras bacteriológicas GK-A, durante 48 hrs. y-- proceder a identificar los microorganismos.

2.- Sistema de muestreo, el muestreo ambiental se debe llevar a cabo con el muestreador volumétrico BIOTEST/RCS, cuyo procedimiento de operación se muestra a continuación:

- Desinfectar el aparato antes de usarse, con alcohol etílico.
- Seleccionar el tiempo de muestreo, a través de los selectores que tiene el aparato, en donde cada uno dura cierto tiempo y aspira un determinado volumen de aire.

Selector 1	(ON)	30 segundos = 20 litros
Selector 2	(ON)	1 minuto = 40 litros
Selector 3	(ON)	2 minutos = 80 litros
Selector 4	(ON)	4 minutos = 160 litros
Todos los selectores	(DOWN)	8 minutos = 320 litros.

El selector puede ser observado en la figura 3:

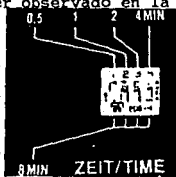


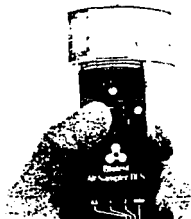
Figura 3. Operación del muestreador de aire volumétrico Biotest/RCS

c) Colocar la tira de agar, tomarla de las esquinas, e insertarla y encender el aparato mediante la presión del botón START, con ello el aparato se encuentra listo para muestrear.

d) Después del muestreo, apagar el aparato, sacar la tira y colocarla en su estuche para incubación.

Estos pasos se muestran a continuación:

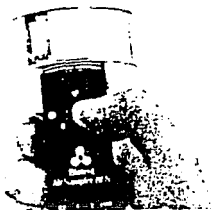
Encender el aparato



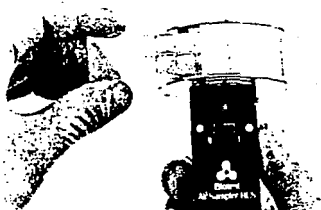
Presionar el botón de START



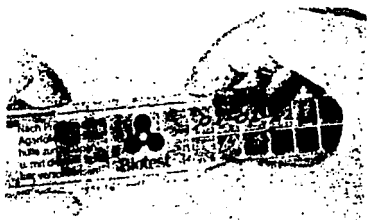
Apagar el aparato



Sacar la tira de agar



Muestra para identificación



**TIRAS DE AGAR**

La composición del medio corresponde a estándares internacionales para garantizar una buena calidad de los resultados. Las tiras de agar se producen bajo condiciones estandarizadas y están selladas en empaque de plástico, se encuentran disponibles en cajas de cincuenta y pueden ser almacenadas de  $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una duración de tres meses, las tiras de agar tienen una área de superficie de  $34 \text{ cm}^2$  y cada tira está dividida en secciones de  $34 \times 1 \text{ cm}$  para su fácil conteo.

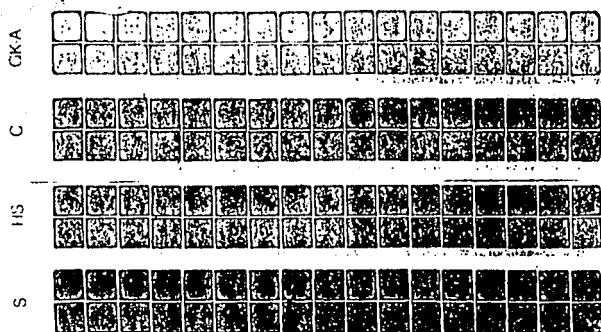
Existen diferentes tipos de tiras de acuerdo a las necesidades que se requieran:

agar GK - A	= para conteo total.
agar Rosa de bengala	= para hongos y levaduras.
agar sal manitol	= para estafilococos.
agar Mc.Conkey	= para bacterias coliformes.

El tiempo y temperatura de incubación varían y se recomienda:

agar GK - A	= incubación de 48h/30° - 35°C
agar Rosa de bengala	= incubación de 120h/28° - 30°C
agar sal manitol	= incubación de 48h/30° - 35°C
agar Mc.Conkey	= incubación de 48h/30° - 35°C

Las características de éstas tiras se pueden observar a continuación:



### 3.- Análisis microbiológico

Consiste en incubar las tiras de cultivo durante 48h/35°C, posteriormente proceder a realizar la cuantificación de las colonias bacterianas y de hongos con el objeto de calcular UFC/m<sup>3</sup> (unidad formadora de colonias por metro cúbico) y observar la proporción de crecimiento de las bacterias con respecto a los demás microorganismos.

Por último, efectuar la identificación de las bacterias por los métodos microbiológicos adecuados.

### 3.3.2 Método B

#### 1.- Sistema de muestreo

El muestreo ambiental debe llevarse a cabo mediante la exposición de las cajas petri, empleándose como medio de cultivo el agar de soya tripticaseina. Tomar las muestras de los puntos críticos y no críticos del área de soluciones orales (ver figura no. 4). El tiempo de muestreo debe ser de treinta minutos, y posteriormente recoger las cajas petri.

#### 2.- Análisis microbiológico

Consiste en la incubación de las cajas petri durante 48h/37°C, para proceder a la cuantificación de colonias bacterianas y hongos con el objeto de observar la proporción de crecimiento de las bacterias con respecto a los demás microorganismos. Por último se procede a efectuar la identificación de las bacterias por los métodos microbiológicos.

#### 3.4 Análisis estadístico

Calcular con los datos obtenidos a través del empleo de los dos métodos la siguiente medida de tendencia central y dispersión:

$$(\bar{X}) \text{ Media} = \frac{\sum m_i f_i}{\sum f_i} \quad (S) \text{ Desviación estándar} = \sqrt{\frac{\sum (m_i - \bar{X})^2 f_i}{\sum f_i - 1}}$$

y el empleo de la prueba estadística de t de Student de acuerdo con el tamaño de la muestra de población analizada con un grado de significancia del 97.5% para comprobar las hipótesis planteadas.

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{Sp^2}{n_1} + \frac{Sp^2}{n_2}}}$$

$S_p^2$  (Estimación mancomunada de la variancia común de las poblaciones)

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$



## CAPITULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos del control ambiental del área de soluciones orales (jarabes).

#### 4.1.1 Resultados del método A:

Durante el chequeo semanal del muestreador volumétrico de aire Biotest/RCS, se observó que tanto las velocidades individuales del rotor así como sus promedios semanales se encuentran dentro de los parámetros fijados por el proveedor, así mismo en lo que respecta al ángulo de las aspas, éstas cumplen con la inclinación angular marcada por el proveedor (ver tabla I).

Los resultados de las pruebas efectuadas al muestreador como instrumento de captación de microorganismos se presentan en la tabla II. El muestreo ambiental realizado en el área de soluciones orales, permitió determinar los microorganismos presentes, cuantificarlos y llevar a cabo el cálculo de UFC/m<sup>3</sup>, los resultados se muestran en la tabla IV.

La identificación de los microorganismos aislados (ver tabla V) se realizó a través de diversas técnicas microbiológicas de rutina. La frecuencia de aparición de los microorganismos se ilustra en la gráfica I en esta gráfica se observa que bacterias del género Staphylococcus, son las más frecuentes mientras que la presencia de los hongos es mucho menor.

#### 4.1.2 Resultados del método B:

El muestreo ambiental en el área de soluciones orales, exhibió variaciones al efectuar la cuantificación de colonias bacterianas y hongos, esto se puede observar en la tabla IV y la frecuencia de las mismas se ilustra en la gráfica II.

Es importante mencionar que se practicaron 930 pruebas bioquímicas para la identificación de las 911 colonias aisladas.

El análisis estadístico aplicado para evaluar la existencia de diferencias significativas en los resultados obtenidos por ambas metodologías se resume en la tabla VI mientras que en la gráfica III se encuentran representados los valores.

**Tabla I: Chequeo semanal del muestreador volumétrico de aire  
Biotest/RCS**

Chequeo número	Velocidades del rotor (Revoluciones por minuto)	Promedio de velocidad	Parámetro de velocidad fijado por el proveedor	Verificación del ángulo de las aspas
1	4095 4079 4080 4090 4093	4087.4	4096 $\pm$ 2%	bien
2	4078 4095 4085 4071 4092	4084.2	4096 $\pm$ 2%	bien
3	4090 4075 4083 4082 4091	4084.2	4096 $\pm$ 2%	bien
4	4090 4095 4090 4089 4088	4090.4	4096 $\pm$ 2%	bien
5	4090 4095 4093 4091 4091	4092	4096 $\pm$ 2%	bien
6	4093 4092 4090 4095 4090	4092	4096 $\pm$ 2%	bien

**Tabla II: Resultados de las pruebas preliminares**

Muestreo semanal	No. de tiras	No. total de bacterias	Bacterias identificadas
1	1	15	8- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	2	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	3	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	4	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	5	13	6- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
2	1	13	8- <u>E.coli</u> 5- <u>P.aeruginosa</u>
	2	13	6- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	3	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	4	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	5	13	6- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
3	1	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	2	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	3	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	4	18	9- <u>E.coli</u> 9- <u>P.aeruginosa</u>
	5	18	9- <u>E.coli</u> 9- <u>P.aeruginosa</u>
4	1	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	2	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	3	13	7- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	4	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	5	13	7- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
5	1	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	2	17	9- <u>E.coli</u> 8- <u>P.aeruginosa</u>
	3	13	6- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	4	13	7- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	5	12	6- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
6	1	13	8- <u>E.coli</u> 5- <u>P.aeruginosa</u>
	2	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	3	13	6- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>
	4	14	8- <u>E.coli</u> 6- <u>P.aeruginosa</u>
	5	14	7- <u>E.coli</u> 7- <u>P.aeruginosa</u>

**Tabla III: Cuantificación de colonias microbianas presentes en el aire del área de soluciones orales por medio del método A**

Muestras (días)	Sitio de muestreo	UFC/m <sup>3</sup>	Colonias bacterianas	Hongos	Colonias totales
1	1-20	40.625	13	0	13
2	1-20	53.125	17	0	17
3	1-20	71.185	23	0	23
4	1-20	90.625	29	0	29
5	1-20	96.875	30	1	31
6	1-20	109.375	32	3	35
7	1-20	121.875	36	3	39
8	1-20	125.0	36	4	40
9	1-20	128.125	36	5	41
10	1-20	121.875	36	3	39
11	1-20	118.75	37	1	38
12	1-20	103.125	33	0	33
13	1-20	96.875	31	0	31
14	1-20	87.5	28	0	28
15	1-20	78.128	25	0	25
16	1-20	65.625	21	0	21
17	1-20	59.375	19	0	19
18	1-20	53.125	17	0	17
19	1-20	50.0	16	0	16
20	1-20	46.875	15	0	15
21	1-20	40.625	13	0	13

1-20: Puntos críticos y no críticos en el área de soluciones (arabes) (fig. 4)

**Tabla IV: Cuantificación de colonias microbianas presentes en el aire dentro del área de soluciones orales por medio del método B**

Muestras (días)	Sitio de muestreo	Colonias bacterianas	Hongos	Colonias totales
1	1-20	6	0	6
2	1-20	8	0	8
3	1-20	13	0	13
4	1-20	20	0	20
5	1-20	21	1	21
6	1-20	24	1	25
7	1-20	30	1	31
8	1-20	30	2	32
9	1-20	32	3	35
10	1-20	30	1	31
11	1-20	26	0	26
12	1-20	22	0	22
13	1-20	19	0	19
14	1-20	17	0	17
15	1-20	15	0	15
16	1-20	15	0	15
17	1-20	12	0	12
18	1-20	9	0	9
19	1-20	7	0	7
20	1-20	7	0	7
21	1-20	6	0	6

**Tabla V: Microorganismos aislados e identificados siguiendo los métodos "A" y "B" y la frecuencia con que son determinados**

Método A	Frecuencia	Método B	Frecuencia
1. <u>Staphylococcus saprophyticus</u>	295	1. <u>Staphylococcus saprophyticus</u>	176
2. <u>Staphylococcus epidermidis</u>	63	2. <u>Staphylococcus epidermidis</u>	55
3. <u>Staphylococcus aureus</u>	58	3. <u>Staphylococcus aureus</u>	52
4. <u>Pseudomona aeruginosa</u>	56	4. <u>Pseudomona aeruginosa</u>	50
5. <u>Enterobacter aerogenes</u>	40	5. <u>Enterobacter aerogenes</u>	35
6. <u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	16	6. <u>Aspergillus sp.</u>	9
7. <u>Micrococcus sp.</u>	15		
8. <u>Aspergillus sp.</u>	11		
9. <u>Mucor sp.</u>	9		



TABLA VI

Cálculos estadísticos para la comprobación de la hipótesis planteada

Método A		Método B	
No. de muestras	Colonias Totales	No. de muestras	Colonias Totales
-----	-----	-----	-----
1	13	1	6
2	17	2	8
3	23	3	13
4	29	4	20
5	31	5	21
6	35	6	25
7	39	7	31
8	40	8	32
9	41	9	35
10	39	10	31
11	38	11	26
12	33	12	22
13	31	13	19
14	28	14	17
15	25	15	15
16	21	16	15
17	19	17	12
18	17	18	9

## ...CONTINUACION DE LA TABLA VI

19	16	19	7
20	15	20	7
21	13	21	6

No. total de microorganismos	= 563	No. total de microorganismos	= 377
No. de muestras	= 21	No. de muestras	= 21
Media	= 26.80	Media	= 17.95
Desviación estándar	= 9.71	Desviación estándar	= 9.37

$Sp^2$  (Estimación mancomunada de la variancia común de las poblaciones)

$$Sp^2 = 91.04$$

$$\text{Grados de libertad} = 40$$

$$t \text{ de student} = 3.01$$

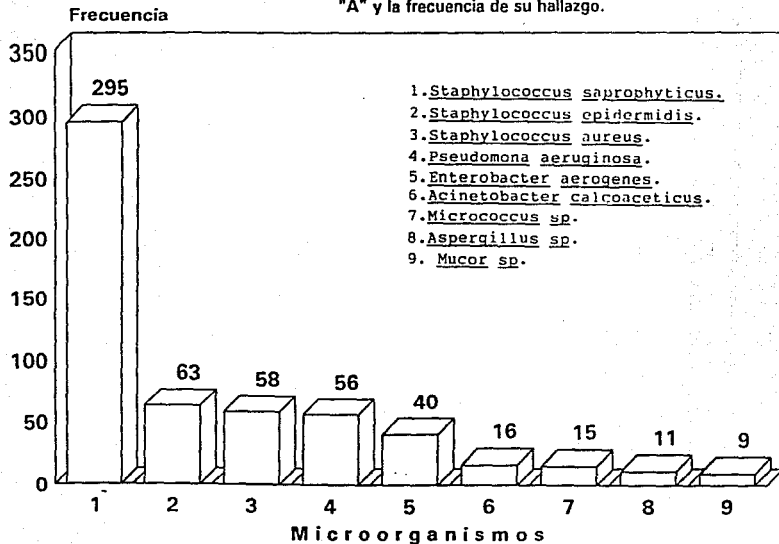
$$\alpha = 0.05$$

$$/t/ \text{ de tablas } 0.975 = \pm 2.021$$

Conclusión:  $/t/$  calculada = 3.01 y es mayor que  $/t/$  de tablas =  $\pm 2.021$  que tiene un grado de significación del 97.5% por lo que se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ . Lo anterior debido a que  $/t/$  calculada cae fuera de la región de aceptación (ver gráfica III).

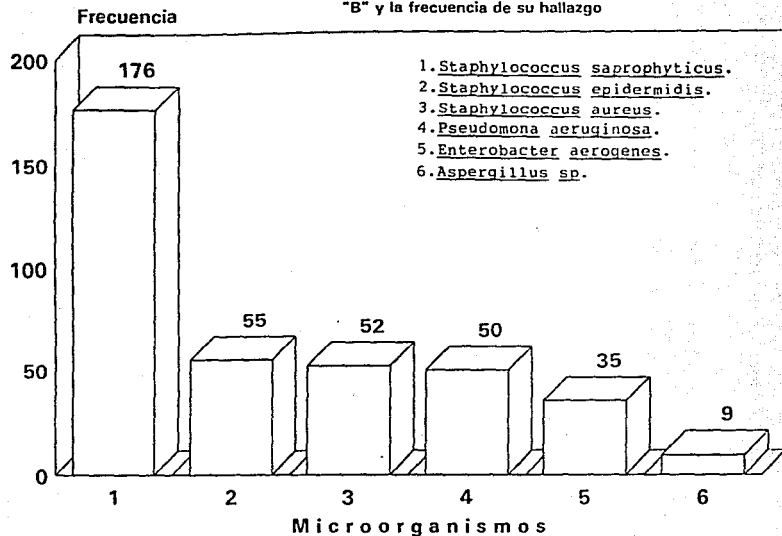
# Gráfica I

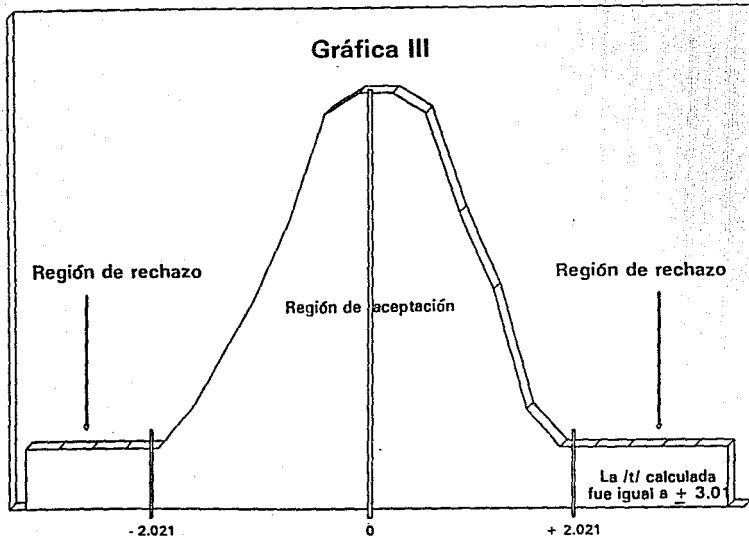
Microorganismos aislados e identificados siguiendo el método "A" y la frecuencia de su hallazgo.



## Gráfica II

Microorganismos aislados e identificados siguiendo el método "B" y la frecuencia de su hallazgo





#### 4.2 Discusión

El afirmar que se obtienen mejores resultados, con el empleo del muestreador volumétrico de aire Biotest/RCS (método A) en comparación con el uso de cajas petri (método B), para lograr un control de calidad ambiental adecuado, se apoya no sólo en las ventajas que ofrece el método mecánico ( A ) en comparación con el método convencional ( B ), sino también en el resultado que arroja la cuantificación de colonias microbianas presentes en el ambiente (ver tablas III y IV), lo anterior es semejante con lo reportado en diversas investigaciones que se han realizado sobre el tema. (7,12,14 y 17)

El resultado que arrojan las pruebas estadísticas que de acuerdo a los datos obtenidos, presentan el rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) y la comprobación de la hipótesis alterna ( $H_a$ ), se fundamenta en el uso de la prueba de hipótesis para dos medias muestrales, empleando el estadístico t de student, la razón para ello, esta basada en el hecho de que las muestras poblacionales son menores a 30 observaciones, lo cual presenta las condiciones favorables para emplear dicha prueba (ver tabla VI y gráfica número III).

En lo que respecta a los microorganismos aislados e identificados siguiendo los métodos A y B así como la frecuencia con que son determinados, se obtuvo que el método A capta un mayor número de microorganismos (ver tabla V).

Es importante mencionar que eligiendo en método A, se obtendrá una mayor calidad y oportunidad en la detección y cuantificación de microorganismos presentes en el aire ambiental, dando así la información necesaria para el control de programas de desinfección, sistemas de tratamiento, descontaminación atmosférica, etc. y tener seguridad de que cubrirá las necesidades, requerimientos y estándares que hoy en día exige el control de calidad ambiental. (5,6,7,11 y 17)

## C A P I T U L O   V



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio, determinan las ventajas del método mecánico (A), sobre el método convencional (B), observando una mayor eficacia del primero en la determinación del control ambiental. Las conclusiones son las siguientes:

1) Se acepta la hipótesis alterna, ya que el estudio estadístico demostró que la eficiencia del método mecánico de muestreo ambiental (A), fue mejor y más efectivo para detectar la calidad microbiológica del aire, en comparación con la del método convencional (B).

2) Durante el manejo de ambas metodologías y a través de la revisión bibliográfica (5,6,7,11,17), se observaron las siguientes ventajas y desventajas en ambos métodos, las cuales son citadas a continuación:

**Método A (Evaluación del aire ambiental por el examinador centrifugal Biotest/RCS)**

### a) Ventajas

Fácil manejo del aparato, gran velocidad en la captación de microorganismos, es portátil y flexible, lo que facilita su uso en cualquier posición. El muestreo se realiza en un tiempo mínimo en intervalos que van desde 30 seg. hasta 8 minutos. El muestreador emplea como principio de colección impactación sobre superficies sólidas que en este caso son tiras de agar nutritivo. El muestreador Biotest/RCS requiere poca inversión inicial y su costo de operación es muy bajo lo cual lo hace

altamente económico para el control de calidad ambiental. El muestreador no requiere de ninguna dilución para el conteo de microorganismos, muestra las colonias representativas del área analizada, el nivel de sonido es bajo (aproximadamente 49---db). El aire despedido no contamina el área de muestreo (este cálculo está basado en un margen de error del  $\pm 2.0\%$  La determinación del volumen de aire es controlada----- electrónicamente, Hay diferentes tiras de agar que se pueden usar de acuerdo a los microorganismos que se necesite cuantificar.

#### **b) Desventajas**

El volumen de separación de aire del muestreador es de 40 litros por minuto, el instrumento tiene un límite de---- detección. Las tiras de agar pueden deshidratarse. Puede--- coleccionar partículas mayores de 4 micras y provocar ruptura en las aspas.

**Método B (Evaluación del control ambiental por sedimentación)**

#### **a) Ventajas**

El método es fácil de usar, no requiere de subcultivos, es--- económico, se pueden emplear varios medios de cultivo, se--- pueden utilizar varias cajas petri. Puede ser representativa la contaminación obtenida de cada una de las áreas estudiadas.

#### **b) Desventajas**

La eficacia del muestreo es afectada por la temperatura y movimiento del aire. Los resultados no son relativos a la---

cuenta bacteriana del volumen de aire muestreado, la velocidad y dirección del flujo de aire del lugar de exposición de la caja petri influye en los resultados de la prueba. La--- confiabilidad es cuestionable para medidas cuantitativas porque no se conoce el volumen de aire muestreado y el perfil de la medida de las partículas distribuidas en el ambiente. Colecta- partículas no desintegrables. Los límites de detección no están bien establecidos y probablemente son variables, en comparación con el examinador Biotest/RCS cuyo límite de detección es de 320 litros cada 8 min. a una velocidad de 40 litros por minuto. Dado que es importante la vigilancia de la calidad del aire dentro de las plantas farmacéuticas, la cuantificación de colonias microbianas presentes en el ambiente, es relevante como puede observarse en las tablas III, IV, y V el método mecánico (A), colectó con frecuencia un mayor número de colonias microbianas en comparación con el método convencional (B), lo que refuerza las conclusiones a que se llegaron en este estudio.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Abdou M.A.F.: "Determination of airborne microorganisms in a pharmaceutical plant using standard elective and selective culture media". Pharma. Tech. 4,93-100 (1980).
- 2) American Society for testing and Materials, Standard method of sampling manufactured gas, American Society Technology Materials, Designation: D124-5L, Philadelphia, P.A.; U.S.A. (1980).
- 3) Cattaneo J.: "HVAC and The clean room". Pharmaceutical Engineering vol.4, nb 6, nov - dec. (1984).
- 4) Cox C.S.: "THE AEROBIOLOGICAL PATWAY OF MICROORGANISMS" John Wiley and Sons, 1a. edición New York, N.Y. (1987).
- 5) Curso de Control Ambiental, Higiene y Seguridad Personal. Instituto Mexicano del Seguro Social (Memorias), Mayo (1985).
- 6) Curso de evaluación y validación de sistemas críticos en áreas asépticas. Asociación Farmacéutica Politécnica A.C. , México D.F. Memorias 1992. (1992).
- 7) Fundamentos del programa de monitoreo microbiológico ambiental. Reporte del Contingente naval y Asociación Farmacéutica; U.S.A. ( 1990).
- 8) Groschel D.H.: "Air sampling in hospitals". N.Y. Acad. Sci. 0353, 230-240 (1980).
- 9) Guidelines for Drug Master Files. Legislative, Professional Affairs.; FDA/CDB HFN-365, 5600 Fishers Lane Rockville, MD 20857. U.S.A. (1990).

- 10) Guidelines for Submitting documentation for the manufacture of and Controls for Drug Products. Legislative, Professional Affairs.; FDA/CDB HFN-365, 5600 Fishers Lane Rockville, MD 20857. U.S.A. (1990).
- 11) Guía de procedimientos Adecuados de Manufactura Farmacéutica. CIPAM, 2ª ed. (1986).
- 12) Huesca Rodríguez Carlos: "Implantación de un programa de control de calidad total en la industria farmacéutica". Tesis. Facultad de Química U.N.A.M. (1991).
- 13) Jones W., Moring K., Morey P. and Sarenson W : "Evaluation of the Andersen viable impactor for single state sampling". Am. Ind. Hyg. Assoc., 45, 294-298 (1985).
- 14) Kaye S. : "Efficiency of Biotest RCS as sampler of airborne bacteria". J. Parenter, Sci. Technol., 42, 147-152 (1988).
- 15) Manual del muestreador ambiental centrífugo Biotest/RCS. Laboratorios de productos biológicos HYLEA S.A de C.V. México, D.F. (1990).
- 16) Testing clean rooms. Practices No. IES-RP-CC006.84T Nov. 1991. Institute of Enviromental Sciences. vol 5 fac. 172-180 pag 940 East Northwest Highway, Illinois 60056. U.S.A. (1991).
- 17) Velázquez Ocadiz J. Antonio: "Consideraciones de diseño, construcción y producción para evitar contaminación en la elaboración de jarabes y suspensiones en la industria farmacéutica". Tesis. Facultad de Química U.N.A.M. (1991).

- 18) Waldheim B.J. : "Microbial aspects of enviromental control in the manufacture of pharmaceuticals, part 2". Br. J. Pharm. Pract., 5, 7, 13 (1983).
- 19) Waldheim B.J.: "Microbiological control of the clean rooms". Pharm. Eng., 8, 21, 23 (1988).
- 20) Winstead M. : "Contamination control in pharmaceutical manufacturing". Contamination control seminar. American Society of Medical Technologist. Seminario Jan 22-24, Chicago IL. U.S.A. (1986).
- 21) Whyte W. : "Monitoring the causes of clean room contamination". Man. Chem. Aerosol. News., 65-81 (Sept 1979).
- 22) Whyte W.: "Setting and impaction of particles into contain in manufacturing pharmacies". J. Parenter. Sci. Technol., 35, 255, 261 (1981).
- 23) Whyte W. : "Airborne bacteria sampling: The effect of dehydration and sampling time". J. Parenter. Sci Technol., 40, 182- 188 (1986).
- 24) Whyte W. : "Sterility assurance and models for assessing airborne bacterial contamination". J. Parenter. Sci. Technol., 40, 188-197 (1986).