

# Centro de Enseñanza Técnica y Superior

Con reconocimiento de validez oficial de estudios del Gobierno del Estado de Baja California según Acuerdo de fecha 10 de octubre de 1983



## **Determinación de especificaciones de solución esterilizante para reducción de desperdicios y retrabajos**

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener  
el grado de Maestro en Ciencias de la Ingeniería

Presenta:

**Paulina Montserrat Pinedo Ruvalcaba**

Director:

Dr. Alejandro Guzmán Ocegueda

Centro de Enseñanza Técnica y Superior (CETYS Universidad)

Tijuana, Baja California, México  
2019

# **DETERMINACIÓN DE ESPECIFICACIONES DE SOLUCIÓN ESTERILIZANTE PARA REDUCCIÓN DE DESPERDICIOS Y RETRABAJOS**

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Ingeniería

Presenta:

**Paulina Montserrat Pinedo Ruvalcaba**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Alejandro Guzmán Ocegueda**

**Dra. Marisela Martínez**

**Dr. Adán Hiraes**

**Mtro. Roberto Salas Corrales**

---

**Dr. Ricardo Martínez Soto**

Coordinador del Posgrado de Ingeniería

Resumen de la tesis que presenta **Paulina Montserrat Pinedo Ruvalcaba** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Ingeniería

**Determinación de especificaciones de solución esterilizante para reducción de desperdicios y retrabajos**

Diseño de pruebas experimentales para la obtención de especificaciones de control post estériles de una solución de glutaraldehído al 0.2% utilizada en proceso de esterilización líquida química para válvulas implantables de tejido animal, obteniendo una mejora en el rendimiento del proceso de esterilización validado para manufactura de industria médica.

Resumen aprobado por:

---

*Dr. Alejandro Guzmán Ocegueda*

Palabras clave: glutaraldehído, esterilización líquida química, válvula implantable de tejido

Abstract of the thesis presented by **Paulina Montserrat Pinedo Ruvalcaba** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Engineering with orientation in

**Determination of sterilizing solution specifications for waste and rework reduction**

Design of experimental tests to obtain post-sterile control specifications of a 0.2% glutaraldehyde solution used in chemical liquid sterilization process for implantable animal tissue valves, obtaining an improvement in the performance of the validated sterilization process for industrial medical manufacturing.

Abstract approved by:

---

*Dr. Alejandro Guzmán Ocegueda*

Keywords: glutaraldehyde, liquid chemical sterilization, implantable tissue valve

## **Dedicatorias**

A mi familia por todo su apoyo a lo largo de mi desarrollo personal y profesional, con especial cariño a mis padres y esposo.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Medtronic por coordinar el programa de especialidad cursado, así como los apoyos financiero y profesional otorgados, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante el programa de posgrados con la industria con número de becario 623983, al Centro de Enseñanza Técnica y Superior (CETYS) por su administrar e impartir el programa de maestría y al programa de Medical Technology Quality (M.S.) de Saint Cloud State University.

## Tabla de contenido

Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias .....	iv
Agradecimientos .....	v
Tabla de contenido .....	vi
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	ix
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Antecedentes .....</b>	<b>3</b>
2.1 Revalidación de procesos de acuerdo con la normativa aplicable.....	3
2.2 Glutaraldehído.....	4
2.3 pH de solución esterilizante y temperatura de proceso .....	5
2.4 Tiempo de esterilización.....	5
2.5 Inoculación.....	6
2.6 Presencia de válvula en la muestra .....	6
<b>Capítulo 3. Justificación .....</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo 4. Hipótesis .....</b>	<b>9</b>
<b>Capítulo 5. Objetivos .....</b>	<b>10</b>
<b>Capítulo 6. Metodología .....</b>	<b>11</b>
6.1 Investigación documental .....	11
6.2 Diseño de experimentos (DOE) .....	11
6.3 Validación de especificaciones para solución esterilizante.....	12
6.4 Análisis de capacidad de proceso para especificación propuesta .....	13
<b>Capítulo 7. Resultados .....</b>	<b>14</b>
7.1 Análisis de diseño de experimentos para pH .....	14
7.2 Análisis de diseño de experimentos para concentración de glutaraldehído .....	16
7.3 Réplicas para determinación de especificaciones post estériles .....	19

7.4 Análisis de capacidad de proceso para especificaciones obtenidas .....	20
<b>Capítulo 8. Discusión.....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo 9. Conclusiones.....</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo 10. Literatura citada .....</b>	<b>26</b>



# Lista de figuras

Figura	Página
<b>Figura 1</b> Entradas y salidas de proceso de esterilización de la válvula A .....	1
<b>Figura 2</b> Comparación de especificación de soluciones entre válvula B (azul) y válvula A (amarillo). Color rojo indica especificación de preparación de soluciones para válvula A para cumplir con especificación post estéril. ....	8
<b>Figura 3</b> Gráfica de Pareto de efectos estandarizados para análisis de pH post estéril .....	14
<b>Figura 4</b> Análisis de Varianza para análisis de resultados de DOE .....	15
<b>Figura 5</b> Intervalo de predicción de regresión lineal al 95% de confianza para análisis de pH post estéril .....	16
<b>Figura 6</b> Gráfica Pareto de Efectos Estandarizados de análisis de concentración de glutaraldehído post estéril .....	17
<b>Figura 7</b> Gráficas de análisis de superficie para análisis de interacción de cuarto nivel de glutaraldehído post estéril .....	18
<b>Figura 8</b> Intervalo de predicción de regresión lineal al 95% de confianza para análisis de concentración de glutaraldehído post estéril .....	19
<b>Figura 9</b> Análisis de capacidad de proceso para pH post estéril .....	21
<b>Figura 10</b> Análisis de capacidad de proceso para glutaraldehído post estéril .....	22

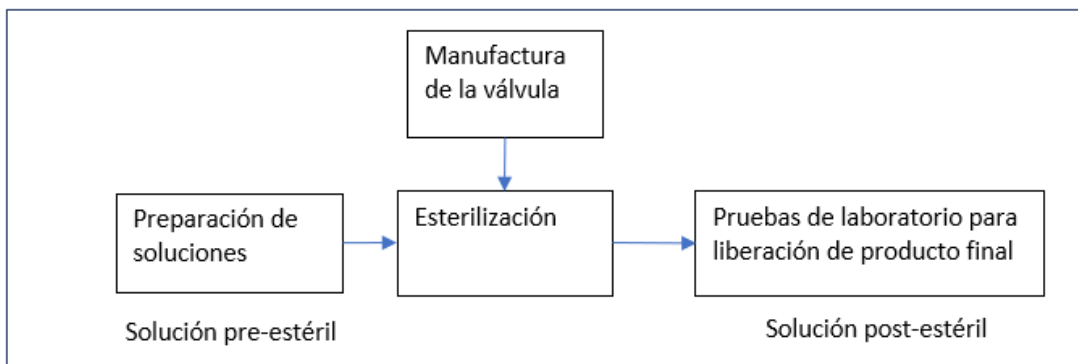
## Lista de tablas

Tabla	Página
<b>Tabla 1</b> Especificaciones de solución esterilizante y capacidad de proceso para la válvula A .....	7
<b>Tabla 2</b> Factores a evaluarse mediante diseño de experimentos.....	12
<b>Tabla 3</b> Comparación de coeficientes de determinación para comparación de modelos de ajuste .....	15
<b>Tabla 4</b> Especificaciones de muestras usadas para ejecución de replicas.....	20
<b>Tabla 5</b> Intervalos de tolerancia obtenida para especificaciones post estériles (confianza 94.3%) .....	20
<b>Tabla 6</b> Capacidad actual y esperada de proceso de preparación de soluciones (especificaciones pre estériles).....	24
<b>Tabla 7</b> Capacidad actual y esperada de proceso de liberación de material terminado (especificaciones post estériles).....	24
<b>Tabla 8</b> Cambios en capacidad de proceso esperados mediante la implementación de este proyecto.....	25

## Capítulo 1. Introducción

El producto A consiste en una válvula de tejido implantable esterilizada mediante un tratamiento líquida químico. Durante la validación inicial del proceso de esterilización fue identificado un riesgo de incumplimiento resuelto mediante especificaciones de solución esterilizante menores a las originales de diseño, asegurando la esterilidad del producto, pero reduciendo la capacidad del proceso. La esterilidad es un requisito indispensable para la venta e implantación de la válvula y no puede ser verificada mediante inspección, por tanto, la capacidad disminuida fue aceptada las especificaciones fueron validadas como parte del proceso de manufactura comercial. De acuerdo con los requisitos de la ISO 14160:2011 bajo la cual es validado este proceso, los parámetros post estériles son monitoreados como confirmación de proceso en estado de control; en el caso de la válvula A la especificación antes y después de esterilizar es la misma.

**Figura 1** Entradas y salidas de proceso de esterilización de la válvula A



Como proyecto interno de mejora, se identificó la esterilidad había resultado comprometida debido al método de prueba de esterilidad y no por el proceso de esterilización. El método de prueba fue mejorado y revalidado con base en las oportunidades observadas, pero la especificación de la solución esterilizante no ha sido modificada, por tanto, la liberación final de la válvula A es entorpecida por resultados de solución esterilizante fuera de especificación incluso cuando los resultados de la prueba de esterilidad por lote son aceptables. Esto resulta en una alta incidencia de retrabajos en el proceso de preparación de soluciones y de liberación de producto terminado, en el caso último implicando un riesgo de pérdida de lote completo pues solo está permitido un retrabajo de esterilización. Adicionalmente, existe evidencia de como las especificaciones post estériles no reflejan la variación natural de la solución durante la exposición al

proceso de esterilización, situación mitigada mediante la implementación de una indicación interna de restricción adicional para especificación pre estéril. Como resultado, el *first pass yield* (porcentaje de producto aceptable a la primera) para el proceso de preparación de soluciones es aprox. 30% y 91% para la liberación de producto terminado en fallas relacionadas a prueba de solución.

La empresa, como continuación de la mejora a este proceso, ejecutó una calificación donde fue validada la apertura de especificaciones de solución pre estéril a los valores de diseño originales pero previo a su implementación es necesario determinar las especificaciones post estériles a acompañar esta nueva especificación

El objetivo de este trabajo es determinar mediante investigación documental y de campo la especificación post estéril correspondiente a un proceso controlado de esterilización para los nuevos parámetros de solución esterilizante de la válvula A, así como predecir la reducción esperada de retrabajos en el proceso de preparación de soluciones (especificaciones pre estériles) y de análisis final de solución esterilizante (especificaciones post estériles) con la implementación de estos cambios de criterio.

La validación inicial de la válvula A no incluyó la determinación de especificaciones post estériles pues en aquel momento la normativa bajo la cual es calificada, la ISO 14160, no lo enumeraba como criterio de liberación. Cuando fue requerido durante el cambio de revisión de la ISO fueron determinados mediante un análisis retrospectivo de producto terminado. Esta estrategia no es conveniente para la nueva determinación de especificaciones pues las repeticiones de prueba con válvula conllevan un gasto aproximado de 300,000 dólares americanos; un segundo objetivo de este trabajo es diseñar y ejecutar una estrategia alternativa menos costosa.

## Capítulo 2. Antecedentes

La estenosis aortica (EA) adquirida es una enfermedad degenerativa presentada la mayoría de las veces como calcificación de las valvas de la válvula aórtica, (Warren & Yong, 1997) los métodos para aliviar definitivamente esta enfermedad son reparación quirúrgica o reemplazo de la válvula, la cual puede ser biológica o mecánica (Goldbarg, et al., 2007), donde las válvulas biológicas son caracterizadas por que alguno de sus componentes es de origen animal como es el caso de la válvula A y sus valvas de tejido bovino.

Las válvulas implantadas como reemplazo permanecen en contacto permanente con tejido mucoso del cuerpo humano, requieren por tanto un tratamiento de esterilización para asegurar el riesgo de contaminación al paciente sea lo más reducido posible.

Un proceso de esterilización es aquel validado para entregar productos libres de cualquier forma de microorganismos viables, sin embargo, es imposible garantizar esterilidad total durante una calificación de proceso, por tanto es utilizado el Nivel de Asegurancia de la Esterilidad (SAL, por sus siglas en inglés) el cual hace referencia a la probabilidad de supervivencia de microorganismos después de un proceso de esterilización terminal (U.S. Department Of Health And Human Services Food and Drug Administration, 2000). Debido a sus componentes de tejido de origen animal, las válvulas biológicas no son candidato a métodos tradicionales de esterilización, como de alta temperatura o exposición a gases, por tanto es utilizado un método de baja temperatura cuyo método de acción está basado en la reactividad química del agente conocido como esterilización líquida química (Wallace, 2016).

La válvula A utiliza como agente esterilizante una solución de glutaraldehído en contacto directo con el producto mientras este es sometido a condiciones controladas de tiempo y temperatura. Para propósitos de este estudio, serán evaluadas las entradas conocidas en el proceso de esterilización y su posible impacto en los resultados post estériles de la solución esterilizante.

### 2.1 Revalidación de procesos de acuerdo con la normativa aplicable

La ISO 14160:2011 para esterilización líquida química para producto de un solo uso con componentes de tejido animal (International Organization for Standardization, 2011)

permite revalidar un cambio de proceso siempre y cuando el método de validación sea lo suficientemente robusto y especifica los requerimientos a cumplirse. No provee requerimientos específicos de revisión de documentos y flujo de trabajo, por tanto es utilizada como soporte la ISO 11134:1994 bajo la cual la revalidación es aceptable siempre y cuando, en caso de un cambio significativo al proceso, sea llevada a cabo mediante una calificación completa (International Organization for Standardization, 1994) (US Food and Drug Administration, 2011).

Los requisitos y procedimiento para la validación de parámetros pre estériles son especificados puntualmente en la ISO 14160:2011, mas no es puntual con respecto al proceso para la determinación de parámetros de control post estériles indicando solamente deben ser monitoreados y estar dentro de especificación. La solución esterilizante lleva a cabo su efecto mediante un proceso químico reactivo, y tiende a sufrir una degradación química al someterse al tiempo y temperatura establecidos por el proceso. Por tanto, queda en responsabilidad del fabricante analizar y determinar las entradas de proceso con efecto sobre las características monitoreadas de la solución esterilizante (pH y concentración de reactivo activo) y la especificación de salida.

## **2.2 Glutaraldehído**

El glutaraldehído es el agente esterilizante del proceso; una molécula lineal de 5 carbonos, lo cual lo hace una molécula relativamente pequeña. Es un líquido claro soluble en agua y alcohol, así como disolventes orgánicos. Está principalmente disponible en soluciones acuosas (pH 3.0-4.0) con un rango de concentración desde menor a 2% hasta 70%, estas soluciones contienen una mezcla de monómeros y formas poliméricas (Migneault, et al., 2004).

Ha tenido un gran éxito comercial debido a su alta disponibilidad, reactividad, eficacia y bajo costo (Bedino, 2003). Sin embargo, sus mecanismos de reacción no han sido del todo entendidos hasta ahora y parte de esto es debido precisamente a su estructura aparentemente simple, (Migneault, et al., 2004) por tanto es difícil predecir y justificar mediante literatura el comportamiento exacto esperado bajo las condiciones del proceso de esterilidad evaluado en este trabajo. A principios de 1970, Boucher (Boucher, 1972) (Boucher, 1974) postuló como la molécula en forma de monómero de la solución de glutaraldehído es la especie o componente activo; esto es respaldado por la práctica,

donde en el proceso de manufactura analizado en este trabajo ha sido observada cómo cuando la proporción de monómeros disminuye en la solución madre de glutaraldehído la reactividad es menor.

El reactivo (glutaraldehído) reacciona durante la esterilización líquida química con el componente a esterilizarse resultando en un consumo, pero es importante considerar también cómo esta reducción de concentración puede verse contrarrestada por una reversión de polímeros a monómeros por efecto de la exposición de la solución al calor (Ruijgrok, et al., 1989). La combinación a estos factores es observada en la práctica como una tendencia de reducción de la concentración en solución post estéril con eventos ocasionales de incremento de concentración. El segundo parámetro monitoreado en la solución es el pH.

### **2.3 pH de solución esterilizante y temperatura de proceso**

El glutaraldehído es tan reactivo que normalmente es comercializado desactivado a un pH alrededor de 3. Para utilizarlo como esterilizante químico frío es necesario llevar y mantenerlo en un pH alcalino alrededor de 7.5-7.8 (Stonehill, et al., 1963). Sin embargo, está demostrado cómo si la temperatura de uso aumenta, la diferencia de actividad entre soluciones alcalinas y ácidas disminuye (Gorman & Scott, 1980) especialmente en temperaturas cerca de los 40 °C (Thomas & Russell, 1974). Esta propiedad es aprovechada en el proceso de esterilización analizado en este trabajo donde la válvula contiene tejido de origen animal a implantarse en un ser humano.

Los estudios de tiempo de vida de anaquel, por otro lado, documentan la tendencia de la solución de glutaraldehído a revertir durante su almacenamiento a su estado más estable mediante disminución de pH.

### **2.4 Tiempo de esterilización**

El amplio espectro de acción del glutaraldehído depende tanto de ser una solución activada con pH como del tiempo de contacto con la sustancia: una solución acuosa al 2% requerirá 1 minuto para ejercer un efecto letal sobre bacterias vegetativas, pero 3 horas para actuar sobre esporas de bacterias. (Borick, 1968). El tiempo evaluado en este trabajo es mayor a 20 horas, muy por encima de los mínimos establecidos por la bibliografía.

## 2.5 Inoculación

El microorganismo utilizado para retar y validar el ciclo de esterilidad es *Bacillus atrophaeus* (*B. atrophaeus*), aplicado a la válvula en forma de spora. Durante su crecimiento produce metabolitos ácidos resultando potencialmente en una alteración de pH a la solución de la válvula (Sella, et al., 2014). Por otro lado, en caso de una esterilización efectiva es esperada una interacción entre el inóculo con el glutaraldehído de la solución. El pH es una de las especificaciones a controlarse, por tanto la inoculación es considerada como una posible entrada de proceso con impacto sobre el valor post estéril de la solución.

## 2.6 Presencia de válvula en la muestra

El proceso de manufactura comienza con un tratamiento donde el tejido fresco sufre una fijación uniaxial en glutaraldehído al 0.5% por un mínimo de 8 horas resultando en un tejido totalmente entrecruzado, por tanto, la expectativa es no observar reactividad entre la válvula y la solución al 0.2% usada para esterilizar.

La válvula representa el producto terminado del proceso de manufactura y, como tal, el elemento más caro del componente final entregado al cliente, así como el repositorio del inóculo adicionado para retar la esterilización en las pruebas por lote.

El análisis de presencia de válvula será incluido en este estudio con el objeto de determinar si la presencia de esta es estadísticamente significativa para la caracterización del comportamiento de la solución de glutaraldehído al ser sometido al proceso de esterilización.



### Capítulo 3. Justificación

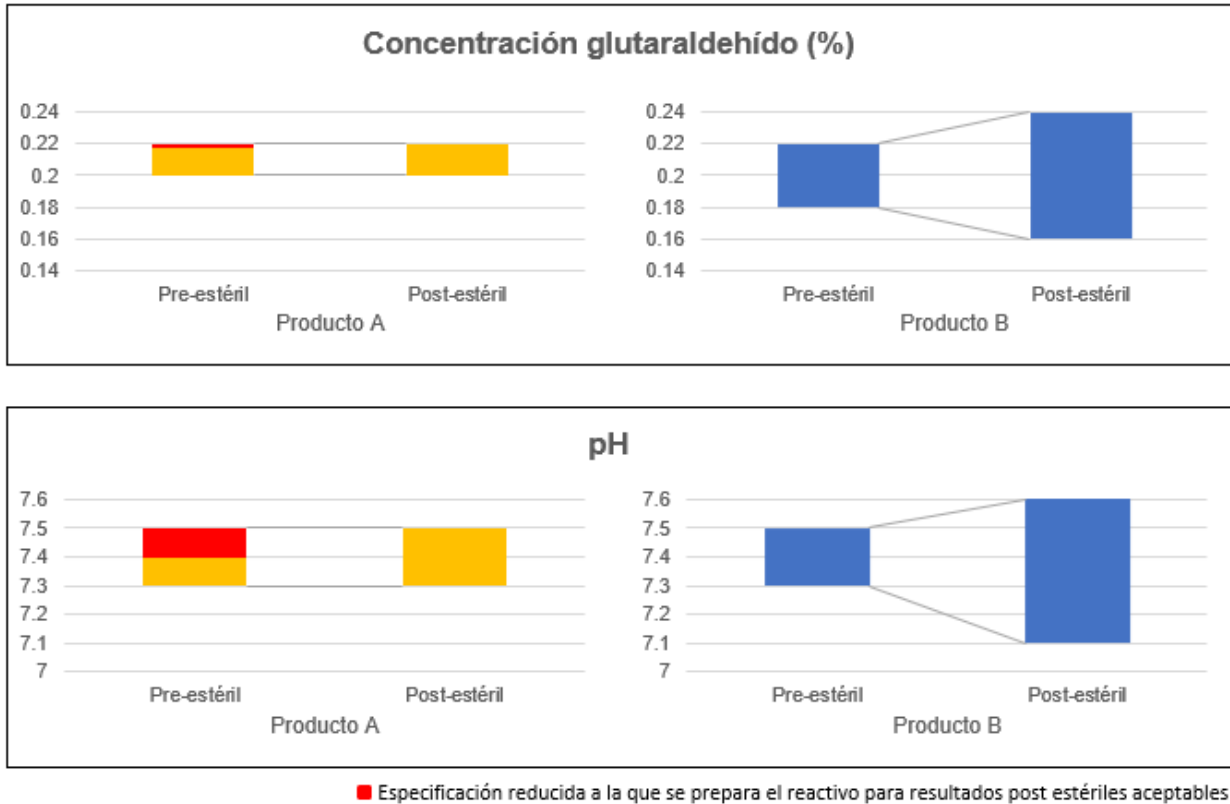
El proceso de liberación de producto terminado es crítico el rendimiento sea aceptable a la primera (*first pass yield*), pues los retrabajos en este proceso pueden llevarse a cabo una sola vez. Resultados no aceptables resultan en la posible disposición como material desechado del lote completo. Para mantener un *first pass yield* de 91% de producto final, las especificaciones de preparación de soluciones fueron reducidas en relación a las validadas traspasando el problema de rendimiento al área de preparación de soluciones, traducido en un *first pass yield* de 30% para esta etapa (Véase tabla 1).

**Tabla 1** Especificaciones de solución esterilizante y capacidad de proceso para la válvula A

Parámetro	Pre estéril		Post estéril	
	Especificación validada	IC Ppk (95%)	Especificación validada y de proceso	IC Ppk (95%)
pH	7.3-7.5	(0.16, 0.33)	7.3-7.5	(0.26, 0.45)
Concentración de glutaraldehído	0.20-0.22%	(-0.02, 0.14)	0.20-0.22%	(0.11, 0.28)

La válvula B, referencia de la misma familia de producto, es esterilizada mediante el mismo proceso, pero con especificaciones post estériles más abiertas en relación a su especificación pre estéril A, y opera con un *first pass yield* de 90% para preparación de soluciones y 98% para liberación de producto final (por fallas relacionadas con prueba de solución).

**Figura 2** Comparación de especificación de soluciones entre válvula B (azul) y válvula A (amarillo). Color rojo indica especificación de preparación de soluciones para válvula A para cumplir con especificación post estéril.



La empresa completó una validación para ampliar la especificación pre estéril de solución de la válvula A a su especificación de diseño original, más previo a su implementación en el proceso de manufactura es necesario determinar las especificaciones post estériles indicadoras de un proceso operando bajo condiciones normales, estudio documental y de campo a presentarse en esta tesis.

**Pregunta de investigación:** ¿La apertura de especificaciones de solución mejora el rendimiento del proceso de preparación de soluciones y liberación de producto terminado?

## Capítulo 4. Hipótesis

**Hipótesis nula:** Los desperdicios en los procesos de preparación de soluciones y liberación de producto terminado son iguales si hay apertura de especificaciones de solución.

**Hipótesis alternativa:** Los desperdicios en los procesos de preparación de soluciones y liberación de producto terminado no son iguales si hay apertura de especificaciones de solución.

## Capítulo 5. Objetivos

1. Determinar mediante investigación documental y de campo la especificación post estéril correspondiente a un proceso controlado de esterilización para los nuevos parámetros validados para la solución esterilizante de la válvula A.
2. Diseñar un sistema de réplicas con bajo costo para proponer especificaciones post estériles dentro de especificaciones de la normativa de validación de procesos, donde la válvula es el componente de mayor costo.
3. Calcular la reducción de retrabajos en el proceso con las especificaciones propuestas.

## Capítulo 6. Metodología

La caracterización y validación de especificaciones post estériles mediante réplicas de proceso de manufactura completo como está actualmente validado tiene un costo elevado para la empresa, por tanto, la primera etapa de la metodología consistió en una investigación documental, reflejada en los antecedentes de este trabajo, para determinar las entradas con posible efecto post estéril sobre el pH y concentración de glutaraldehído de la solución. Estas entradas fueron analizadas mediante un Diseño de Experimentos (DOE, por sus siglas en inglés), el modelo reducido obtenido será utilizado para llevar a cabo las repeticiones de determinación de intervalo de confianza para especificaciones post estériles y determinar si la hipótesis nula es aceptada o no.

### 6.1 Investigación documental

Con base en la investigación documental, las siguientes entradas de proceso fueron seleccionadas como parámetros fijos para la evaluación de solución.

1. Tiempo, está sustentado en un análisis de desactivación cinética y cumple sobradamente la indicación encontrada en bibliografía
2. Temperatura, la especificación actual de proceso ya coincide con la recomendación de los artículos consultados

Los factores elegidos a analizarse para evaluar su efecto sobre el valor post estéril de la solución son:

1. Inoculación, por el efecto acidificante del crecimiento microbiano sobre el medio
2. Concentración pre estéril de glutaraldehído, por su interacción con el inóculo y válvula
3. pH pre estéril, por su interacción con el posible crecimiento del inóculo
4. Presencia de válvula, por su interacción con el consumo de glutaraldehído e inóculo

### 6.2 Diseño de experimentos (DOE)

El DOE fue seleccionado con el objetivo de barrer los factores con posible efecto sobre especificaciones post estériles mediante un factorial  $2^k$ . Las entradas y niveles

seleccionados con representativos de los niveles más altos y bajos validados en proceso, y son los siguientes:

**Tabla 2** Factores a evaluarse mediante diseño de experimentos

<b>Factor</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>Salida</b>
Inoculación	0	10 <sup>6</sup>	pH y concentración glutaraldehído (post estériles)
Concentración glutaraldehído	0.18%	0.22%	
pH	7.3	7.5	
Presencia válvula	Solo solución	Válvula en solución	

La determinación del tamaño mínimo de muestra fue determinada utilizando de referencia la documentación de análisis de riesgo interna, con base en la cual el nivel de confianza debe ser por lo menos del 95% con un poder de 0.95. La desviación estándar para pH y concentración de glutaraldehído fueron obtenidas del histórico de soluciones correspondiente un histórico de un año.

El tamaño seleccionado de muestra para detectar una variación de 0.1 pH, utilizando Minitab 17, es de 70 corridas (cuatro repeticiones con tres puntos centrales por bloque), utilizando una desviación estándar de 0.0792 y un poder de 0.99, con un poder de detección de efectos de hasta 0.0865.

El tamaño de muestra seleccionado para detectar una variación de 0.01% concentración de glutaraldehído, utilizando Minitab 17, es 70 muestras (cuatro repeticiones con tres puntos centrales por bloque), utilizando una desviación estándar de 0.00668 y un poder de 0.99, con un poder de detección de efectos de hasta 0.0073. Considerando como pH y concentración de glutaraldehído son medibles en la misma muestra, se correrá un solo juego de 70 muestras para analizar ambas especificaciones.

### **6.3 Validación de especificaciones para solución esterilizante**

La segunda etapa de la investigación de campo utilizará el modelo reducido obtenido en el DOE para ejecutar 3 réplicas de por lo menos umbral superior y umbral inferior, dependiente de los resultados del diseño, a utilizarse para la obtención del intervalo de confianza de especificaciones post estériles.

#### **6.4 Análisis de capacidad de proceso para especificación propuesta**

Los modelos matemáticos obtenidos en la regresión factorial del diseño de experimentos y las réplicas para determinación de intervalos de confianza serán utilizados para calcular el Ppk esperado de las especificaciones obtenidas en las réplicas con un tamaño de muestra de 50, representativo de un año de producción. Las muestras serán generadas utilizando la herramienta de creación de muestras aleatorias de Minitab, con la desviación estándar conocida para el proceso de preparación de soluciones (0.00649 para concentración de glutaraldehído y 0.0604 para pH) y un promedio basado en el punto central de las nuevas especificaciones.

## Capítulo 7. Resultados

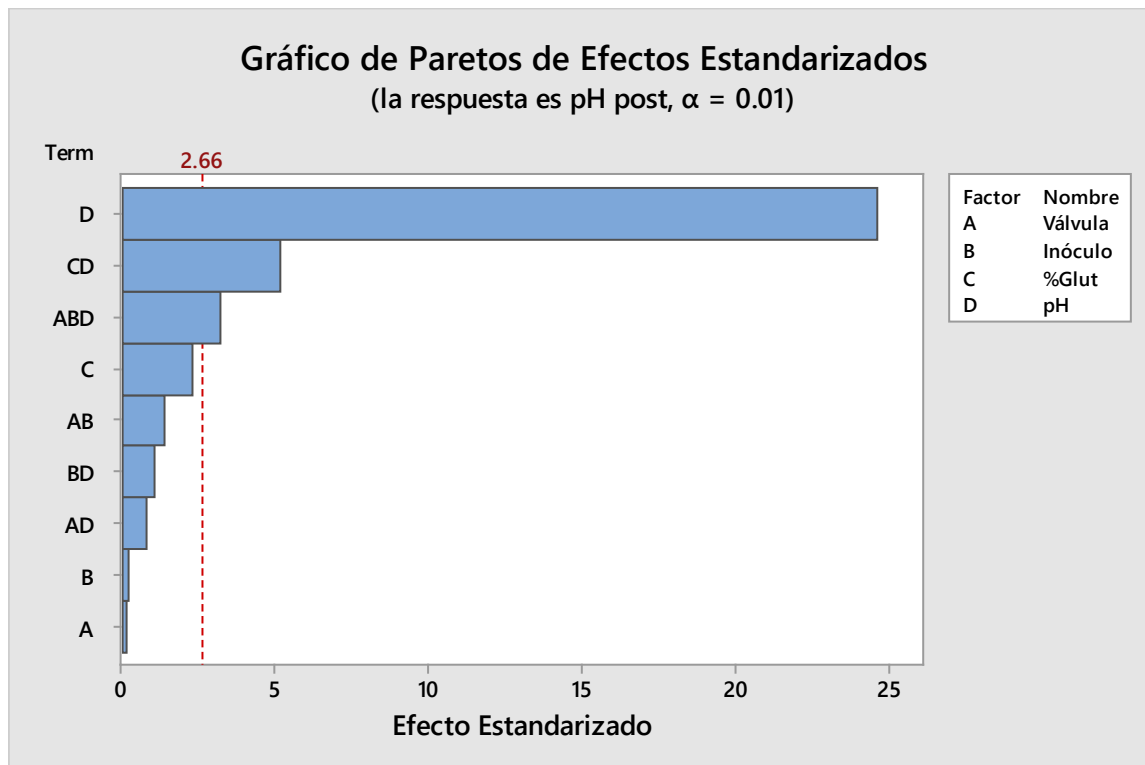
Las salidas de proceso fueron analizadas durante la ejecución de las pruebas de DOE, pH post estéril y concentración de glutaraldehído post estéril. Los resultados de ambos son presentados a continuación.

### 7.1 Análisis de diseño de experimentos para pH

Los resultados experimentales fueron analizados a través de un diseño factorial DOE con un 99% de confianza y un poder de detección de efecto de 0.0865, mejor que el efecto mínimo de detectado por la resolución de la prueba (0.1).

La primera reducción al modelo fue basada en el análisis de efectos estandarizados, donde el factor con mayor impacto en resultados de pH post estériles son D (pH), CD (interacción de concentración de glutaraldehído y pH) y ABD (interacción entre presencia de válvula, inóculo y pH).

**Figura 3** Gráfica de Pareto de efectos estandarizados para análisis de pH post estéril



El modelo reducido obtenido fue sometido a una evaluación de efectos donde, tomando como referencia la resolución de la especificación de pH es de un decimal (0.1), cualquier



efecto menor a este valor fue descartado como irrelevante para propósitos de este estudio. Por tanto:

- CD (interacción entre concentración de glutaraldehído y pH) presenta un efecto de 0.013, basado en el cual puede ser descartado como entrada de proceso significativa para los valores post estériles de pH
- ABD (interacción entre presencia de válvula, inóculo y pH) presenta un efecto de 0.005, basado en el cual puede ser descartado como entrada de proceso significativa para los valores post estériles de pH

El modelo reducido final tiene como factor de entrada con efecto significativo el valor pre estéril de pH de la solución.

**Figura 4** Análisis de Varianza para análisis de resultados de DOE

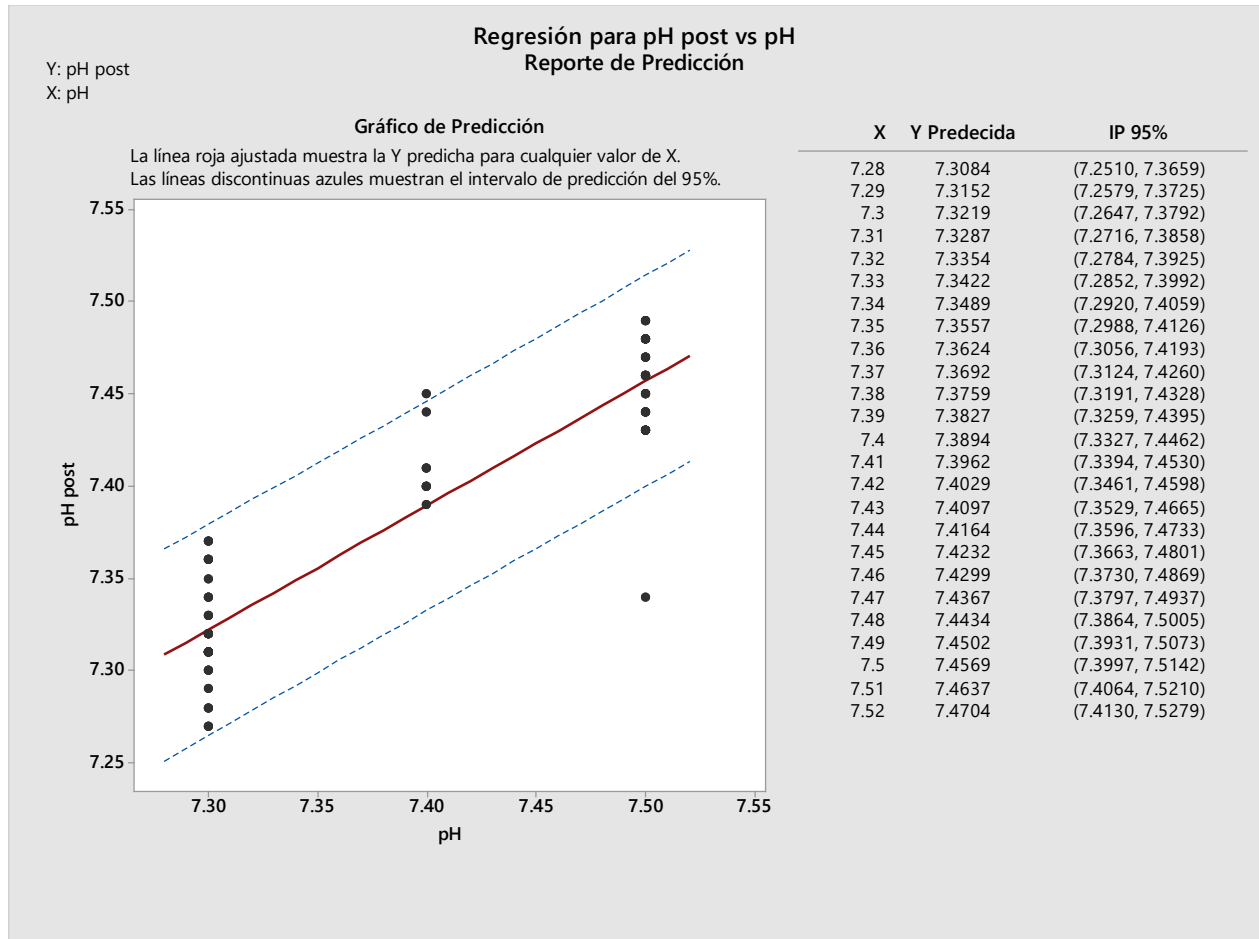
Fuente	GL	SS Ajustada	MS Ajustada	Valor-F	Valor-P
<b>Modelo</b>	1	0.296384	0.148192	199.74	0
<b>Lineal</b>	1	0.291600	0.291600	393.02	0
<b>pH</b>	1	0.291600	0.291600	393.02	0
<b>Error</b>	70	0.004784	0.004784	6.45	0.013
<b>Curvatura</b>	1	0.051194	0.000742		
<b>Falta de ajuste</b>	17	0.024694	0.001453	2.85	0.002
<b>Error puro</b>	52	0.026500	0.000510		
<b>Total</b>	71	0.347578			

El valor  $p$  de la curvatura en el modelo es de 0.013, el cual fue retado a través de un análisis de regresión a un nivel de confianza de 95% ( $\alpha=0.05$ ) para comparación de modelo lineal contra cuadrático, donde la diferencia observada fue de 1.18% en sus respectivos valores de correlación  $R$ -sq, con ambos modelos por encima del 80% individualmente (ver tabla 3). En el análisis de predicción de intervalo al 95% de la figura 5, solo 2 puntos de 70 caen fuera del modelo lineal. El modelo reducido sin curvatura es presentado en la ecuación 1.

**Tabla 3** Comparación de coeficientes de determinación para comparación de modelos de ajuste

	Modelo lineal	Modelo cuadrático	Diferencia
R-sq	83.66%	84.84%	1.18%

**Figura 5** Intervalo de predicción de regresión lineal al 95% de confianza para análisis de pH post estéril

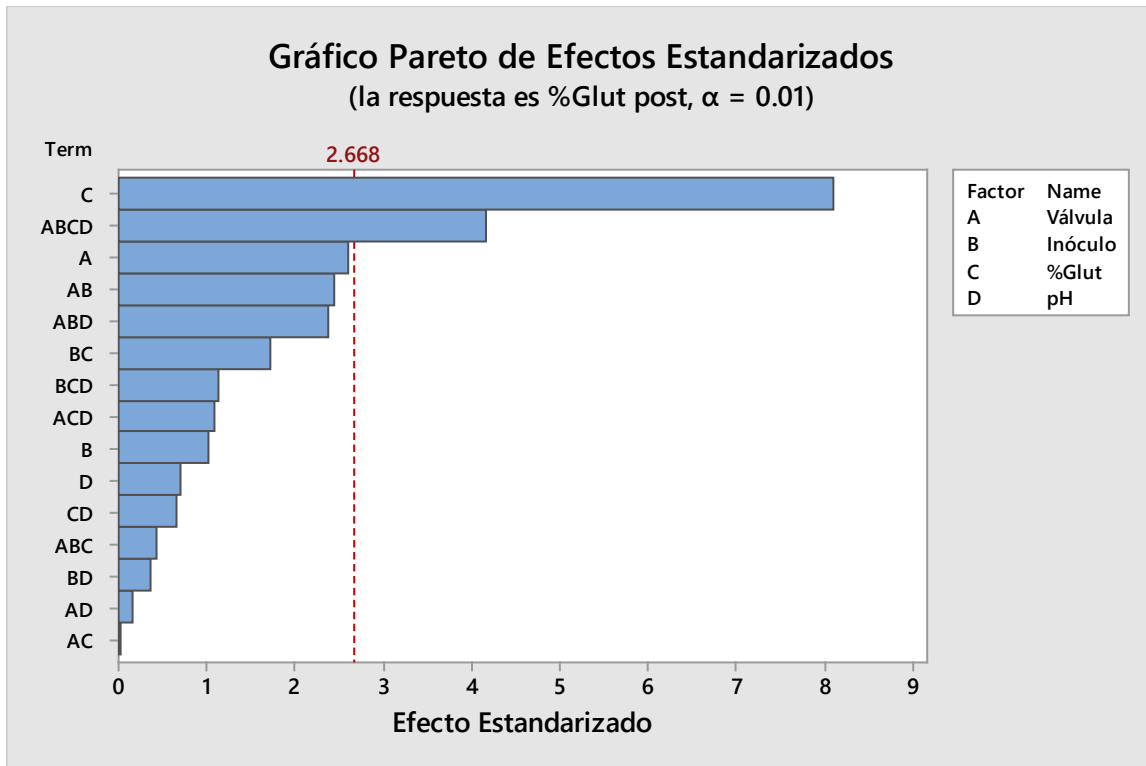


$$pH \text{ post esteril} = 2.394 + (0.6750 * pH \text{ pre esteril}) \quad (1)$$

## 7.2 Análisis de diseño de experimentos para concentración de glutaraldehído

Los resultados experimentales fueron analizados a través de un diseño factorial DOE con un 99% de confianza con un poder de detección de efecto de 0.0073, mejor que el efecto mínimo de detectado por la resolución de la prueba (0.01).

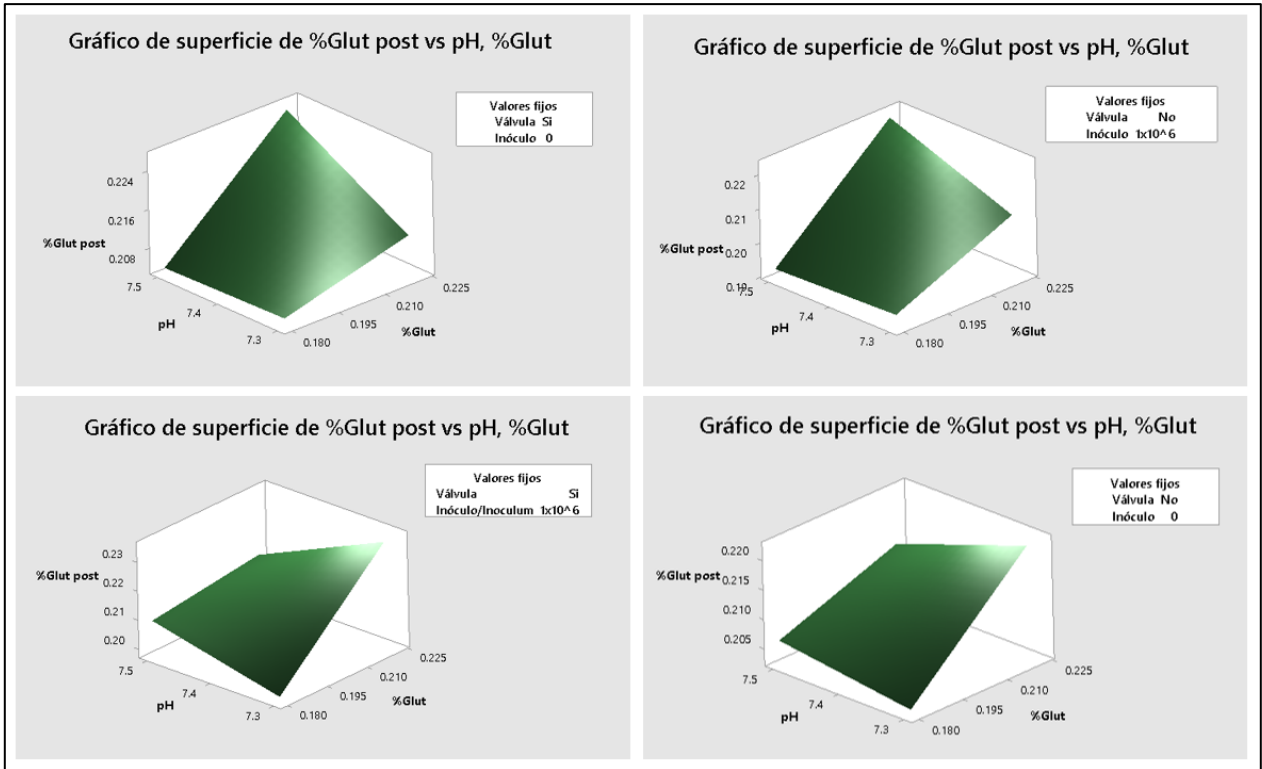
**Figura 6** Gráfica Pareto de Efectos Estandarizados de análisis de concentración de glutaraldehído post estéril



El modelo obtenido tiene un  $R-sq = 66\%$  donde falta de ajuste al modelo contribuye con 1% de la variación y el error puro 33%. Los efectos principales estandarizados fueron identificados como concentración pre esteril de glutaraldehído y una interacción de cuarto nivel de todos los factores, debido al segundo una reducción directa basada en efectos estandarizados no pudo ser llevada a cabo. Con base en el  $p\text{-value} = 0.901$  de la curvatura, esta no es relevante, los puntos centrales fueron removidos para habilitar un análisis de superficie de la relación entre los 4 factores.

La figura 7 presenta los 4 escenarios de interacción para las dos categorías de factores variables (pH y %Glut) y las dos categorías de factores continuos (presencia/ausencia de válvula y presencia/ausencia de inóculo).

**Figura 7** Gráficas de análisis de superficie para análisis de interacción de cuarto nivel de glutaraldehído post estéril

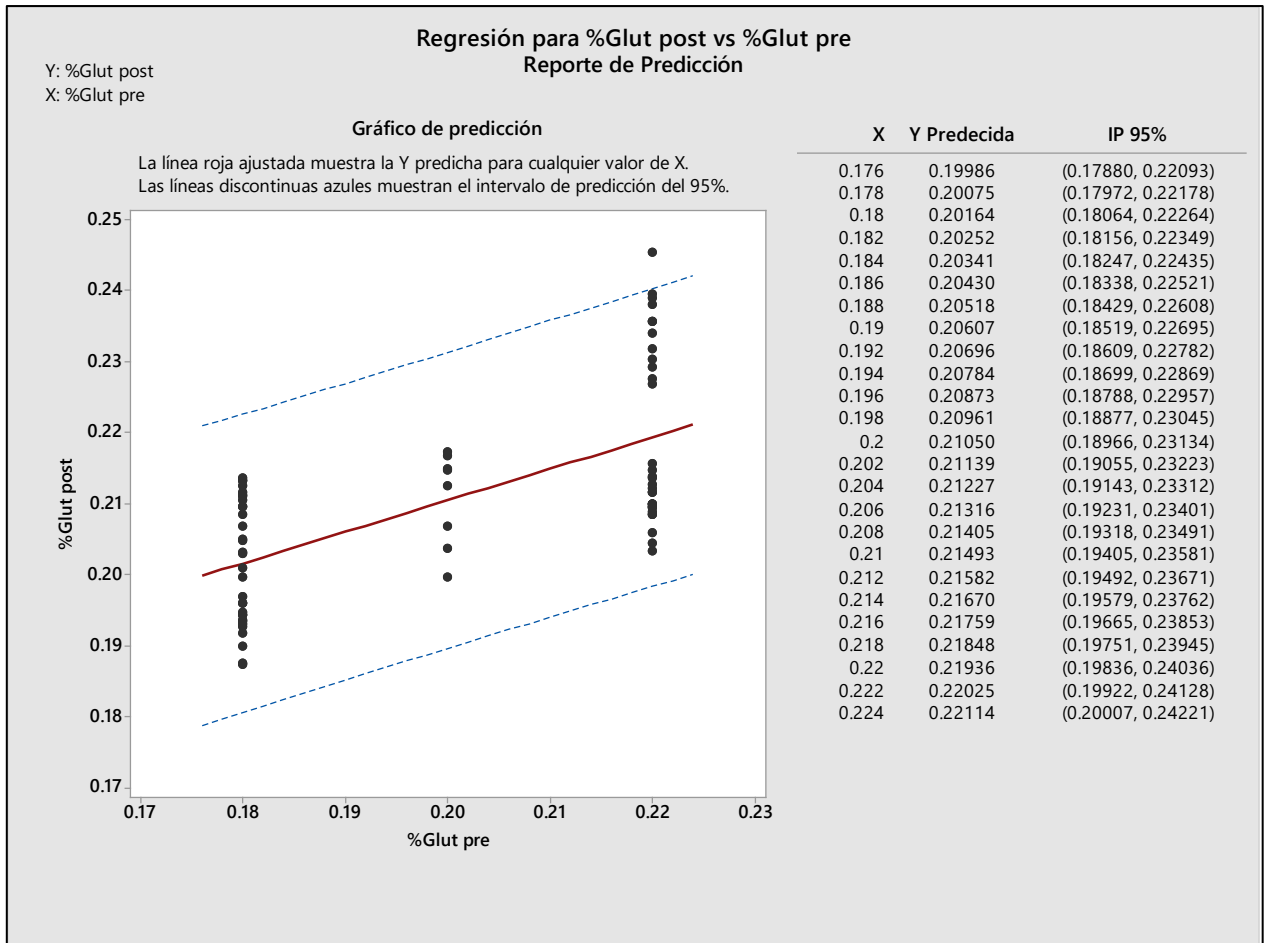


Las graficas de superficie permiten observar como la interaccion esta fuertemente ligada a la relacion entre válvula e inóculo. Tomando de referencia la gráfica de superficie con presencia de válvula e inóculo, representativa del proceso como esta actualmente validado para el análisis de solución, fue detectado un comportamiento similar para la combinacion de ausencia de válvula y ausencia de inóculo. Las combinaciones para ausencia de válvula con presencia de inóculo y presencia de válvula sin presencia de inóculo son descartadas en este análisis, pues el comportamiento post-esteril de concentración de glutaraldehído es graficamente diferente a la condicion utilizada de referencia.

La confirmacion de la similitud observada entre las combinaciones de presencia de válvula con presencia de inóculo y ausencia de válvula con ausencia de inóculo fue llevada a cabo mediante una prueba *t* de dos muestras, concluyendo con un 95% de confianza no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (valor  $p = 0.474$ ).

Se llevó a cabo una verificación del modelo lineal propuesto mediante una regresión lineal al 95% de confianza ( $\alpha=0.05$ ), donde solo uno de los 72 datos experimentales estuvo fuera del intervalo de predicción del modelo (ver figura 8).

**Figura 8** Intervalo de predicción de regresión lineal al 95% de confianza para análisis de concentración de glutaraldehído post estéril



### 7.3 Réplicas para determinación de especificaciones post estériles

Las muestras elegidas para las réplicas de este estudio consisten en solución esterilizante sin presencia de válvula y sin presencia de inóculo expuestas a un doble ciclo de esterilización, representativo del peor escenario de exposición a calor y riesgo de degradación química.

La norma ISO 5479:1997 (International Organization for Standardization, 1997) restringe el uso de pruebas de normalidad en 8 muestras o menos, pues las pruebas son “muy

inefectivas” para estos tamaños de muestra. Con base en este racional y para mantenerse en cumplimiento de la normativa, el número mínimo de muestras requerido por la empresa es de 15. Este tamaño de muestra aplicado para la obtención de intervalos de tolerancia con un nivel de confianza de 95% con 95% de la población dentro del mismo resulta en un margen de error calculado de 5% para método normal (valores calculados utilizando herramienta de cálculo de tamaño de muestra de Minitab 17). Sin embargo, las réplicas pertenecen al umbral superior e inferior de la especificación, por tanto, esta distribución no es la esperada. Para el cálculo de intervalo de tolerancia no normal serán consideradas 90 muestras, obteniéndose un nivel de confianza de 94.3% para el 95% de la población.

El muestreo final elegido es de 15 muestras tomadas por cada lote de solución pre estéril, donde 3 lotes fueron preparados en el límite superior de especificación y 3 en el límite inferior de especificación (ver tabla 4).

**Tabla 4** Especificaciones de muestras usadas para ejecución de replicas

Límite inferior		Límite superior		Total
Especificación	Muestras	Especificación	Muestras	
%Glut 0.18% pH 7.3	45 muestras (15 por lote)	%Glut 0.22 pH 7.5	45 muestras (15 por lote)	90

Los intervalos de tolerancia obtenidos para solución post estéril son presentados en la tabla 5:

**Tabla 5** Intervalos de tolerancia obtenida para especificaciones post estériles (confianza 94.3%)

Parámetro post estéril	Intervalos de tolerancia
% Glutaraldehído	(0.17, 0.24) %
pH	(7.1, 7.6)

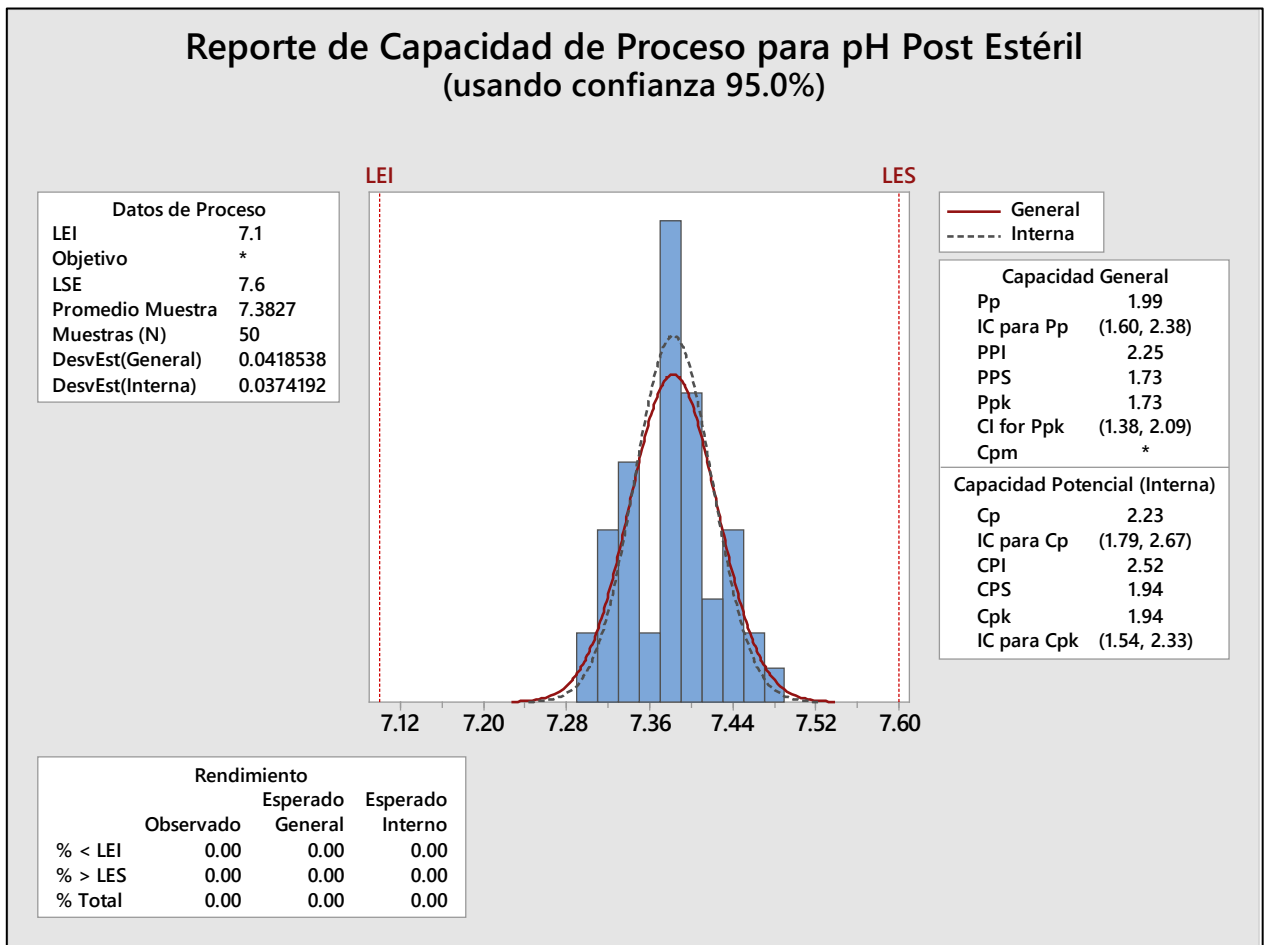
#### 7.4 Análisis de capacidad de proceso para especificaciones obtenidas

La variación conocida de proceso para preparación de soluciones, 0.00649 de desviación estándar para concentración de glutaraldehído y 0.0604 de desviación estándar para pH, fue utilizada para generar 50 datos aleatorios de solución pre estéril con la herramienta de generación de datos en Minitab.

La proyección de capacidad de proceso para pH post estéril utilizo los datos generados aleatoriamente en la formula del modelo reducido obtenida en la Regresión Factorial del Diseño de Experimentos ( $R-sq = 84\%$ ). El intervalo de confianza a un 95% para el Ppk calculado es de (1.38, 2.09).

$$pH \text{ post esteril} = 2.394 + ( 0.6750 * pH \text{ pre esteril} ) \quad ( 2 )$$

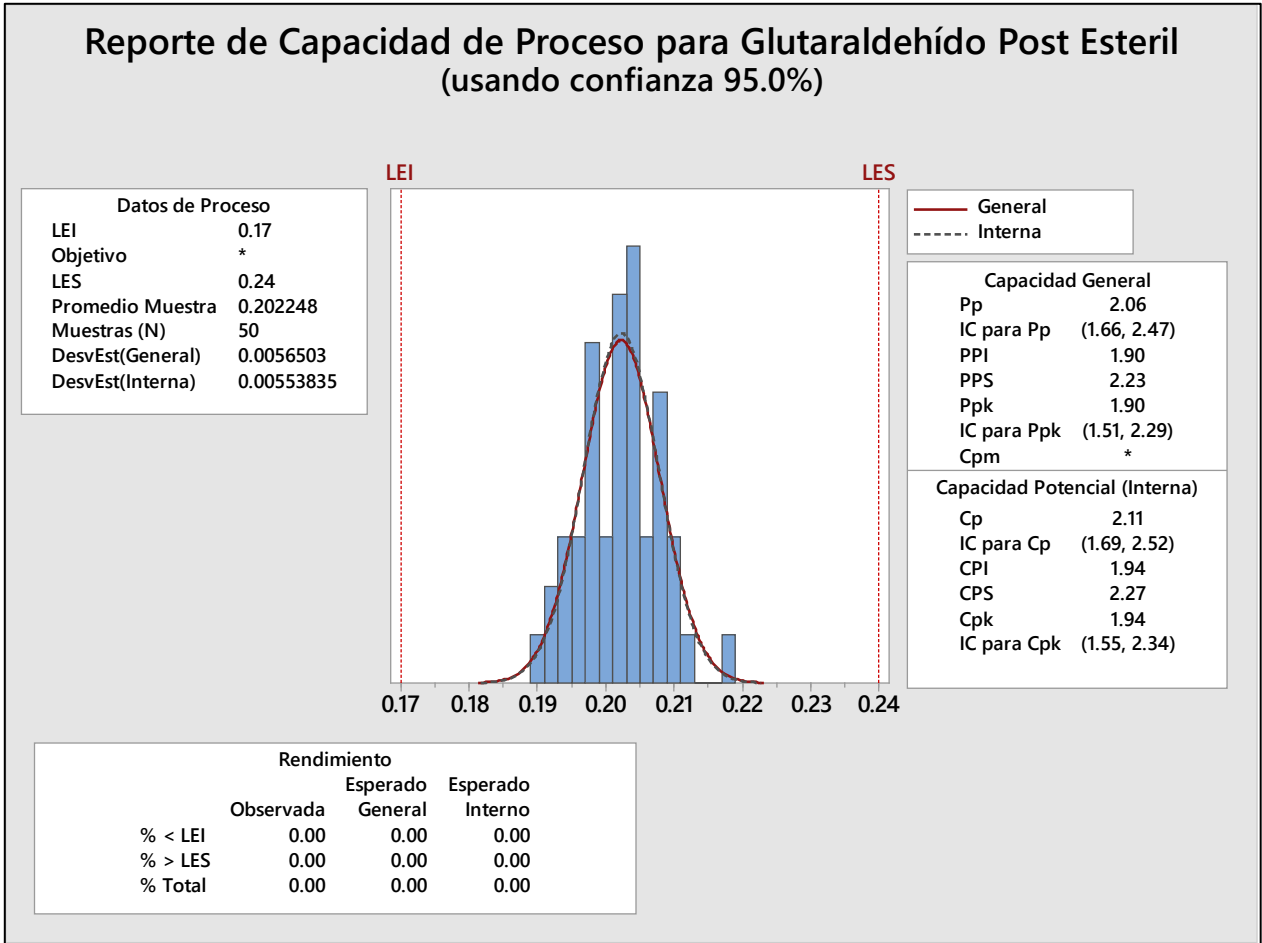
**Figura 9** Análisis de capacidad de proceso para pH post estéril



La proyección de capacidad de proceso para la concentracion de glutaraldehído post estéril utilizó los datos generados aleatoriamente en la formula del modelo obtenido en la regresión lineal obtenida con las 90 muestras de la sección de réplicas de proceso ( $R-sq = 87\%$ ). El intervalo de confianza a un 95% para el Ppk calculado es de (1.51, 2.29).

$$\%Glut \text{ post esteril} = 0.01111 + ( 0.9556 * \%Glut \text{ pre esteril} ) \quad ( 3 )$$

**Figura 10** Análisis de capacidad de proceso para glutaraldehído post estéril





## Capítulo 8. Discusión

La interacción entre válvula e inóculo y su efecto sobre el comportamiento general de la concentración post estéril de glutaraldehído es una línea de investigación con oportunidad de desarrollo, particularmente basado las observaciones de un mismo comportamiento general durante su interacción con los demás factores.

Los modelos propuestos en este estudio son lineales, mediante revisión de ajuste del modelo a través de un análisis de regresión lineal dentro de los puntos mínimos y máximos del estudio. Para pH en particular, si el modelo es usado para valores fuera de los rangos abarcados en este estudio es altamente recomendado volver a ejecutar pruebas de linealidad basado en la leve curvatura observada durante la regresión factorial del diseño de experimentos.

La revisión de las especificaciones propuestas con el departamento de Ingeniería e Investigación, dueños del diseño de la válvula, determino inviable cambiar el intervalo inferior post estéril de acuerdo a lo encontrado en este estudio, con base en datos de pruebas para vida de anaquel donde está registrada la tendencia del pH a disminuir con el almacenamiento. A pesar de que la relación es lineal y es posible estimar con un nivel de confianza razonable hasta cual punto en la escala de pH reduciría el valor post estéril con la nueva especificación, no fueron encontrados datos experimentales para respaldar la integridad de la válvula y sus propiedades mecánicas no sean comprometidas. Queda abierta la oportunidad para determinar a qué pH es comprometido el funcionamiento mecánico de la válvula, y después de cuánto tiempo. Por otro lado, la apertura de la especificación superior no compromete estas pruebas y mejora la capacidad del proceso en relación al estado inicial (ver tabla 7), reduciendo el porcentaje de material fuera de especificación a 2.4% sin implicar un proceso fuera de control. En el lapso durante el cual sea sometido a aprobación este proyecto (aproximadamente dos años, por aprobaciones de organismos regulatorios), y previo a su implementación, es recomendable mejorar el proceso de preparación de soluciones enfocado en la disminución de variación de pH.

**Tabla 6** Capacidad actual y esperada de proceso de preparación de soluciones (especificaciones pre estériles)

Parámetro	Inicial		Propuesto y aprobado por departamento de Investigación y Desarrollo	
	Especificación validada	IC Ppk (95%)	Especificación validada y de proceso	IC Ppk (95%)
pH	7.3-7.5	(0.16, 0.33)	7.3-7.5	(0.26, 0.45)
Concentración de glutaraldehído	0.20-0.22%	(-0.02, 0.14)	0.20-0.22%	(0.11, 0.28)

**Tabla 7** Capacidad actual y esperada de proceso de liberación de material terminado (especificaciones post estériles)

Parámetro	Inicial		Propuesto		Aprobado por Investigación y Desarrollo	
	Especificación	IC Ppk (95%)	Especificación	IC Ppk (95%)	Especificación	IC Ppk (95%)
pH	7.3-7.5	(0.26, 0.45)	7.1-7.6	(1.38, 2.09)	7.3-7.6	(0.50, 0.82)
Concentración de glutaraldehído	0.20-0.22%	(0.11, 0.28)	0.17-0.24%	(1.51, 2.29)	0.17-0.24%	(1.51, 2.29)

## Capítulo 9. Conclusiones

La investigación conducida en esta tesis permite concluir con el rechazo de la hipótesis nula, basado en la ausencia de traslape en los intervalos de confianza de capacidad de proceso inicial y propuesta con una reducción de retrabajos proyectada a largo plazo de aproximadamente 20% (ver tabla 8).

En segundo lugar, fue confirmada mediante datos experimentales la relación entre valores pre estériles y post estériles, donde el pH post estéril depende principalmente del valor de pH pre estéril y la concentración de glutaraldehído post estéril depende principalmente de la concentración pre estéril de glutaraldehído, permitiendo justificar monitoreos y mejoras de proceso a futuro donde la disponibilidad y/o costo de la válvula no sea un impedimento.

**Tabla 8** Cambios en capacidad de proceso esperados mediante la implementación de este proyecto

Parámetro	Actual			A implementarse		
	Especificación	IC Ppk (95%)	Porcentaje esperado fuera de especificación con base en Ppk	Especificación	IC Ppk (95%)	Porcentaje esperado fuera de especificación con base en Ppk
pH	7.3-7.5	(0.26, 0.45)	21.6%	7.3-7.6	(0.50, 0.82)	2.4%
Concentración de glutaraldehído	0.20-0.22%	(0.11, 0.28)	28.30%	0.17-0.24%	(1.51, 2.29)	0%

## Capítulo 10. Literatura citada

- Bedino, J. H., 2003. Embalming chemistry: Glutaraldehyde versus Formaldehyde. In: *Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices*. Springfield(Ohio): The Champion Company, pp. 2614-2632.
- Borick, P. M., 1968. Chemical sterilizers (chemosterilizers). *Advances in Applied Microbiology*, Volume 10, pp. 291-312.
- Boucher, R. M., 1972. Advances in sterilization techniques. State of the art and recent breakthroughs. *American Journal of Hospital Pharmacy*, Volume 29, pp. 661-672.
- Boucher, R. M., 1974. Potentiated acid 1,5 pentanedial solution--a new chemical sterilizing and disinfecting agent. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 31(6), pp. 546-557.
- Goldbarg, S. H., Elmariah, S., Miller, M. A. & Fuster, V., 2007. Insights Into Degenerative Aortic Valve Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 25 septiembre, 50(13), pp. 1205-1213.
- Gorman, S. P. & Scott, E. M., 1980. A review: Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. Volume 48, pp. 161-190.
- International Organization for Standardization, 1994. *ISO 11134:1994 Sterilization of health care products -- Requirements for validation and routine control -- Industrial moist heat sterilization*. [Online] Available at: <https://www.iso.org/standard/19153.html>
- International Organization for Standardization, 1997. *ISO 5479:1997 Statistical interpretation of data -- Tests for departure from the normal distribution*, s.l.: s.n.
- International Organization for Standardization, 2011. *Sterilization of health care products -- Liquid chemical sterilizing agents for single-use medical devices utilizing animal tissues and their derivatives-- Requirements for characterization, development, validation and routine control of a sterilization p*. [Online] Available at: <https://www.iso.org/standard/44956.html> [Accessed 04 06 2018].
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. & Waldron, K. C., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, Noviembre, 37(5), pp. 790-802.
- Ruijgrok, J. M., Boon, M. E. & De Wijn, J. R., 1989. The effect of heating by microwave irradiation and by conventional heating on the aldehyde concentration in aqueous glutaraldehyde solutions. *The Histochemical Journal*, Junio, 22(6-7), pp. 389-393.
- Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S. & Soccol, C. R., 2014. Bacillus atrophaeus: main characteristics and biotechnological applications – a review. *Informa healthcare*, pp. 1-13.
- Stonehill, A. A., Krop, S. & Borick, P. M., 1963. Buffered glutaraldehyde, a new chemical sterilizing solution. *American Journal of Hospital Pharmacy*, Volume 20, pp. 458-465.

- Thomas, S. & Russell, A. D., 1974. Temperature-Induced Changes in the Sporicidal Activity and Chemical Properties of Glutaraldehyde. *Applied Microbiology*, 28(3), pp. 331-335.
- U.S. Department Of Health And Human Services Food and Drug Administration, 2000. *Content and Format of Premarket Notification [510(k)] Submissions for Liquid Chemical Sterilants/High Level Disinfectants*. s.l.:s.n.
- US Food and Drug Administration, 2011. Guidance for Industry, Process Validation: General Principles and Practices. *Current Good Manufacturing Practices (CGMP)*, p. 22.
- Wallace, C. A., 2016. New developments in disinfection and sterilization. *American Journal of Infection Control*, Volume 44, pp. e23-e27.
- Warren, B. A. & Yong, J. L., 1997. Calcification of the aortic valve: Its progression and grading. *Pathology*, Volume 29, pp. 360-368.