

## APLICACIÓN DE LA TERMODINÁMICA Y EL DISEÑO, EN PROCESOS INDUSTRIALES: EL CASO DE LA ESTERILIZACIÓN

### APPLICATION OF THE THERMODYNAMICS AND THE DESIGN, IN INDUSTRIAL PROCESSES: THE CASE OF STERILIZATION

LUIS ERNESTO ALFEREZ RIVAS<sup>1</sup>

NAYIVE NIEVES PIMIENTO<sup>2</sup>

IVÁN ANDRÉS SABATA T.<sup>3</sup>

JHON WILSON GARCÍA C.<sup>4</sup>

#### RESUMEN

En la industria ensambladora de autoclaves en el ámbito nacional aparecen numerosos procesos en la cadena de producción. En éstos, el control de los procesos térmicos se ha convertido en una tarea crítica y fundamental, y es de interés investigar exhaustivamente, en presencia de temperatura, tanto la reproducción como la eliminación de microorganismos. En tal sentido, este artículo se centra en el proceso de la esterilización, por lo que describe sus conceptos teóricos fundamentales más relevantes, así como los subprocesos que aparecen. Igualmente, se hace un estudio que parte de la modelación matemática y se centra en la experimentación, orientada a la evaluación de la efectividad del proceso, así como en el análisis, diseño y ejecución de un protocolo de validación de éste. Las autoclavadas experimentales se realizaron por triplicado y se registró automáticamente las temperaturas de dieciséis canales de medición; se calculó, en tiempo real, el tiempo equivalente ( $F_0$ ) en cada uno de los canales y se realizó simultáneamente un desafío con un indicador biológico combinado con un indicador químico. Los resultados experimentales demostraron la efectividad de los procesos estudiados, con los patrones de carga definidos, así como la configuración de los ciclos del esterilizador. Como perspectiva, se plantea extender los resultados en los entornos hospitalarios.

1 Ingeniero Químico, Universidad América. Especialista en Matemática Aplicada a Sistemas Dinámicos, Universidad Sergio Arboleda. Integrante del grupo de energías alternativas de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Correo electrónico: lealferezr@udistrital.edu.co

2 Ingeniero Mecánico, Universidad Pontificia Bolivariana, Estudiante de Maestría en Ciencias Ambientales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Correo electrónico: nnievesp@udistrital.edu.co

3 Ingeniero Mecánico, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Correo electrónico: ivan.sabata@gmail.com

4 Ingeniero Mecánico, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Correo electrónico: jhowig16@yahoo.es

### Palabras clave

Tiempo equivalente, autoclave, purgado, esterilización, validación, biondicadores, perfil de temperatura.

### Abstract

In the assembly industry of autoclaves at a national level, a number of processes appear in the chain of production. In them, the control of thermal processes has become a critical and fundamental task, and is of interest to investigate exhaustively, in the presence of temperature, the reproduction as the elimination of microorganisms. In such sense, this article is centered in the process of sterilization, describing its fundamental theoretical concepts as well as the subprocesses that appear. Likewise, a study is conducted that springs from the mathematical modeling, and it is centered in the experimentation oriented to the evaluation of the effectiveness of the process, as well as in the analysis, design and execution of a protocol of validation of the same one. The experimental autoclaves were automatically made by triplicate, registering automatically the temperatures of 16 channels of measurement; calculating, in real time, the equivalent time ( $F_0$ ) in each one of the channels and taking place simultaneously a challenge with a combined biological indicator with a chemical tracer. The experimental results demonstrated the effectiveness of the studied processes, with the patterns of defined load, as well as the configuration of the cycles of the sterilizer. As a perspective, it is considered to extend the results in the hospital environments.

### Keywords

Equivalent time, sterilizer, bled, sterilization, validation, biondicadores, profile of temperature.

## 1. INTRODUCCIÓN

Para el mundo de los microorganismos es fundamental el requerimiento de calor, ya que cierta cantidad de calor favorece su crecimiento y re-

producción, mientras que otra cantidad de calor favorece su eliminación. En la industria en la que aplica la esterilización es de interés primordial tanto la reproducción como la eliminación de microorganismos, es ahí donde radica la importancia del control de los procesos térmicos. La termodinámica es la herramienta mediante la cual se puede diseñar y controlar los equipos mediante los cuales los microorganismos se pueden reproducir o eliminar, según diversos requisitos de calidad.

El calor es un concepto complejo, por lo que el hombre trató de transformarlo en una variable de mayor simplicidad de manejo; encontrando la siguiente ecuación:

$$Q = m \cdot C_p \cdot dT$$

Donde Q = calor

m = masa

$C_p$  = capacidad calorífica del material.

dT = diferencia de temperatura.

De la ecuación anterior la variable que se puede controlar fácilmente es la temperatura; entonces, la problemática para reproducir o eliminar microorganismos se reduce a controlar la temperatura. Esto conlleva a diseñar equipos adecuados a las necesidades que tengamos, por ejemplo:

Proceso farmacéutico	Temperatura a controlar	Tiempo requerido	Equipo	Resultado trabajando con microorganismos
Refrigeración	2.0 a 8.0 °C	Depende de PNO y tipo microorganismo	Refrigeradores, congeladores	Conservación de la vida del microorganismo
Incubación	Desde 25.0 a 50.0 °C	Depende del microorganismo y los nutrientes	Estufas de incubación	Reproducción de microorganismos
Esterilización	Mínima 121.0 °C	Tiempo mínimo 15 minutos o alcanzar un $F_0 = 12$	Autoclaves, hornos	Eliminación de microorganismos, con determinados nutrientes
Despirogenización	Mínima 250.0 °C	Tiempo Mínimo 1 hora y/o alcanzar un $F_p = 12$	Hornos	Eliminación de los desechos de los microorganismos

A través del tiempo, cualquier equipo térmico va a presentar desgaste y desviaciones con respecto a su diseño original, lo que puede ser riesgoso en una industria que trabaja la esterilización (elaboración de medicamentos, fármacos, alimentos y esterilización de instrumentación quirúrgica) los cuales son afectados por el óptimo desempeño de sus equipos.

Para resolver esta problemática nace como alternativa la validación de procesos, que mediante estudios periódicos (de seis meses a un año), garantiza que el comportamiento térmico de los equipos es adecuado para reproducir o eliminar microorganismos en los procesos de esterilización.

Todo este proceso es desarrollado, tanto del material como el de medios contaminados (proceso esencial en todo laboratorio de cultivo in Vitro) está dado por la esterilización, que se suele efectuar con calor húmedo en equipos denominados autoclaves.

El autoclave es un instrumento habitual en los laboratorios de cultivo in vitro. En esencia, un

autoclave es un recipiente en el que se consigue exponer el material que se va a esterilizar a temperaturas superiores a la de ebullición del agua, debido al aumento en la presión.

El proceso completo de esterilización en un autoclave se compone de diferentes fases:

- Fase de purgado: a medida que la resistencia calienta el agua del fondo del calderín, se va produciendo vapor que desplaza el aire, haciéndolo salir por la válvula de purgado que está abierta. Esta fase termina cuando se alcanza la temperatura de esterilización.
- Fase de esterilización: una vez cerrada la válvula de purgado y alcanzada la temperatura de esterilización previamente seleccionada se inicia el proceso de esterilización.
- Fase de descarga: terminado el proceso de esterilización, deja de funcionar la resistencia calefactora, con lo que deja de producirse vapor y la presión y temperatura del calderín empieza a bajar poco a poco.

## 2. FIABILIDAD Y TRAZABILIDAD DE LOS PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN

El objetivo de una instalación productora de formas industriales estériles es fabricar un producto libre de microorganismos capaces de reproducirse en el propio producto o después de su administración a un paciente.

Para lograr este objetivo la fabricación de soluciones parenterales es típicamente acompañada de una esterilización terminal o mediante procesamiento aséptico; sin embargo, ambos procesos tienen sus limitaciones. Los procesos de esterilización terminal no son aplicables a los productos termosensibles por la degradación que sufren, debido a la acción del calor. Por otro lado, el procesamiento aséptico ha estado históricamente asociado con fallos en la esterilidad y el retiro de productos del mercado [2].

Independientemente del método utilizado, para lograr la esterilidad de un producto es indiscutible la importancia que tiene el equipamiento empleado en este proceso, ocupando un lugar fundamental las autoclaves o esterilizadores. Es debido a esto que la calificación de los equipos involucrados y la validación de los procesos ejecutados en ellos sean de sumo interés para garantizar la calidad y la seguridad de los productos farmacéuticos e industriales. Además, las regulaciones nacionales e internacionales establecen que todos los procesos críticos deben ser validados y validables, haciendo marcado énfasis en los procesos de esterilización.

Los esterilizadores modernos son diseñados y fabricados bajo estrictas normas y cuentan además de los dispositivos de seguridad y de otras características que aseguran la fiabilidad y trazabilidad de los procesos, con un sistema de control completamente automatizado que se ocupa no sólo de la ejecución de todas y cada una de las etapas de un ciclo de esterilización, sino también de la

verificación de las condiciones de operación para evitar daños en el equipo, en el proceso e, incluso, en el operador [1].

Una particularidad importante es que estos sistemas de control permiten el registro, en papel o en formato electrónico, de todos los parámetros de los ciclos ejecutados, lo cual, además de ser un requisito exigido por las regulaciones y las buenas prácticas de esterilización, permite la detección de posibles condiciones de fallo, aún antes de que ocurran. Otro aspecto importante en el control de los ciclos de esterilización, mediante vapor saturado, es que además del tradicional control mediante la combinación tiempo temperatura es posible controlar por un parámetro denominado "tiempo equivalente". Esta variante es de suma importancia en los procesos de esterilización en los cuales la carga es termolábil, pues evita una exposición prolongada al calor. Este enfoque es usualmente empleado en el caso de líquidos.

La esterilización por vapor saturado es el mecanismo mejor comprendido para la destrucción de la vida microbiana. Es el método preferido en equipos que puedan operar en el rango de 120 a 135 °C. Aunque aún existen diferencias entre los especialistas, en cuanto al mecanismo de muerte a escala molecular, hay un acuerdo universal acerca de los tres parámetros críticos que afectan la esterilización: presión, temperatura y la tasa de fugas en tuberías y accesorios [5].

Cuando una población grande de células bacterianas, esporas o virus son expuestos al vapor saturado a una temperatura fija el número de sobrevivientes puede ser determinado como una función del tiempo de exposición a una temperatura y presión controladas. La temperatura afecta dramáticamente la tasa de muerte. Al aumentar la temperatura la resistencia de los microorganismos disminuye sensiblemente, por lo que en la misma unidad de tiempo se observa una acentuada disminución de su población.

El efecto de la presión en la esterilización por calor es evidenciada por las grandes diferencias observadas en las temperaturas requeridas por la esterilización mediante 959-212-095-1 © 2003, Sociedad Cubana de Bioingeniería, artículo T\_0111 2/4 calor seco y la esterilización mediante calor húmedo. La combinación de temperatura con la presión controlada tiene un efecto directo para la calidad del vapor con el empleo de este método.

Mientras que un proceso de calor seco ocurre generalmente entre 160 y 180 °C, un proceso de calor húmedo ocurre a temperaturas mucho menores, que varían desde 115 °C hasta 135 °C [1], [5]. Este fenómeno ha sido atribuido a que la presencia de agua disminuye la temperatura requerida para desnaturalizar las proteínas; sin embargo, en el caso del calor seco se requiere inicialmente un proceso de deshidratación antes de que la temperatura alcance un valor suficiente para producir la desnaturalización o coagulación de las proteínas, consecuentemente este es un proceso de oxidación, con una cinética diferente al proceso de calor húmedo [1], [3], [5].

En el enfoque cinético de la muerte microbiana se asume frecuentemente que esta sigue un modelo similar a una reacción química de primer orden. Se ha encontrado experimentalmente que la tasa de muerte, la cual es medida en términos prácticos, como una tasa de supervivencia, tiene un comportamiento exponencial, en el cual la constante de velocidad de reacción  $k$  del paso más lento, es la que controla el proceso [1], [5], tal como se muestra en la expresión (1):

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (1)$$

donde:

$N$ : población microbiana en cualquier instante  
 $N_0$ : población microbiana inicial  
 $k$ : constante de velocidad de reacción  
 $t$ : tiempo  
 $e$ : base de los logaritmos neperianos

La caracterización y estudio de un proceso de esterilización térmico requiere de la medición de los perfiles de temperatura, presión, fugas en accesorios y tuberías; además de un reto con un microorganismo, empleado como bioindicador, cuyos parámetros de resistencia al calor sean conocidos y cuantificables; estos parámetros se denominan  $D$  y  $Z$ .

El valor  $D$ , conocido también como tiempo de reducción decimal, es una magnitud cuantitativa del índice de muerte de los microorganismos. Se define como el tiempo requerido en minutos, a una temperatura y presión específica, para lograr una reducción de un orden de magnitud, esto equivale a una reducción del 90% de la población microbiana inicial [4], [6], [7]. El valor  $D$  permite una comparación directa de la resistencia al calor de varios microorganismos.

Un cambio en la temperatura o la presión afecta de forma significativa la tasa de muerte de las bacterias. Al aumentar la temperatura, el  $\log D$  disminuye de forma lineal y esta dependencia se define a través de  $Z$  y se expresa en °C. El valor  $Z$  se define como el cambio de temperatura requerido para reducir el valor  $D$  en un orden de magnitud, lo cual es igual a una reducción del 90% del propio valor  $D$ , [4], [6], [7].

El microorganismo, usualmente empleado como desafío, es el *B. stearothermophilus*, ampliamente conocido por su resistencia al calor. Los valores más comunes de  $D$  varían entre 1,0 y 3,0 minutos a 121 °C, mientras que el valor  $Z$  oscila entre 8 y 13 °C [1], [6], aunque recientemente el autor ha empleado en estudios de validación indicadores biológicos con un valor  $Z = 30$  °C.

Una vez conocidos estos parámetros es posible desarrollar un modelo matemático que permita calcular la capacidad de un proceso de esterilización, para eliminar los microorganismos, en términos de letalidad, según la expresión (2):

$$L = 10^{\frac{(T-T_b)}{Z}} \quad (2)$$

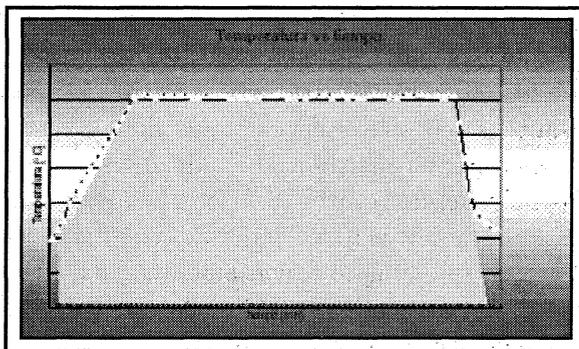
donde:

- L: letalidad
- T: temperatura instantánea
- T<sub>b</sub>: temperatura base
- Z: valor Z

La letalidad puede ser determinada en un instante dado, pero si se calcula la sumatoria de todas las letalidades acumuladas, es decir, si se integra como una función de la temperatura en el tiempo ( $L = f(T, t)$ ), entonces es posible calcular el tiempo equivalente F. La expresión (3) es:

$$F = \int_{t_1}^{t_2} L dt \quad (3)$$

Una solución gráfica de esta ecuación implicaría calcular el área bajo la curva en un gráfico de temperatura versus tiempo, según se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** El área bajo la curva en un gráfico de Temperatura vs. tiempo, equivale al tiempo equivalente ó valor F. No obstante la solución nuérica es la más empleada.

El valor F es definido como el “tiempo equivalente” durante el cual un producto ha sido sometido a una temperatura y a una presión de esterilización determinada [4], [6], [7]. En el cálculo de F se toman en consideración distintos factores: la temperatura instantánea en cualquier momento, la temperatura base, el valor Z y el intervalo de tiempo. El concepto de tiempo equivalente necesariamente implica que este tiempo es diferente al tiempo real [4], [6], [7]. La solución de la ecuación 3 se expresa en la forma siguiente:

$$F = \Delta t \cdot \Sigma 10^{\frac{(T-T_b)}{Z}} \quad (4)$$

donde:

- F: tiempo equivalente (min)
- T: temperatura instantánea (°C)
- T<sub>b</sub>: temperatura base (°C)
- Z: valor Z (10 °C)
- Δt: intervalo de tiempo (min)

En el caso particular de la esterilización por vapor saturado, la temperatura base (T<sub>b</sub>) es igual a 121 °C y el valor Z es igual a 10 °C, en ese caso el término F se denomina F<sub>0</sub>.

### 2.1 Protocolo de validación

Para ejecutar el estudio se diseñó un protocolo de validación en el cual se describen las pruebas necesarias, así como la metodología que se a seguir en su ejecución. Las fases de mayor interés que abarcan este trabajo, fueron las etapas de calificación de la operación y de calificación del desempeño.

El registro de los perfiles de temperatura fue realizado con un sistema de medición de temperatura industrial, formado por un indicador de temperatura tipo multipunto de marca Omega INC., de doce canales para termorresistencias tipo RTD Pt10 modelo RD250-12-PT-0/200C, con formato de calibración No TE-145-06. La calibración inicial,

previa a las corridas, se realizó en tres temperaturas: 100, 121 y 140°C, empleando para ello un termómetro digital con Pt100, certificado por la Superintendencia de Industria y Comercio. Luego de esto, todos los accesorios usados en el ensamble de las autoclaves tales como válvulas antiretorno (cheques), válvulas solenoides, válvulas de bola y de cortina. A continuación se mencionan las pruebas de mayor relevancia:

- Prueba de hermeticidad.
- Distribución de temperatura con cámara vacía.
- Penetración de calor sin reto.
- Penetración de calor con reto.

El objetivo de la primera prueba es demostrar que la cámara es hermética, lo cual implica que no hay posibilidad de penetración de aire no filtrado (aire no estéril) hacia el interior del esterilizador, ya que esta condición puede comprometer la fiabilidad del proceso, en las etapas finales. Esta prueba se realiza ejecutando el programa de prueba de vacío del esterilizador y registrando el perfil de la presión. La pérdida de vacío no debe ser superior a 13 mbar en un periodo de 10 minutos (prueba de la tasa de fuga).

Los estudios de distribución de temperatura con cámara vacía y cámara cargada tienen como objetivo demostrar que la cámara del esterilizador es homogénea y que la presencia de la carga no afecta la distribución de calor, respectivamente. Esta prueba es ejecutada fijando las Pt100 del indicador de temperatura homogéneamente, en el interior de la cámara y registrando el perfil de temperatura.

Por último, los estudios de penetración de calor persiguen demostrar la eficiencia con que el vapor saturado es capaz de penetrar en los materiales y objetos que se pretenden esterilizar. La medición de temperatura sólo da un criterio físico: sin embargo, el desafío microbiológico da un criterio bio-

lógico de la efectividad del proceso. En este estudio las termoresistencias se colocan en el interior de la carga, conjuntamente con los indicadores químicos de barra móvil y las ampollas conteniendo esporas del microorganismo de reto.

El estudio requirió la ejecución de varias corridas experimentales en el siguiente orden cronológico: prueba de hermeticidad, distribución de temperatura con cámara vacía y penetración de calor con reto microbiológico.

### 3. DATOS EXPERIMENTALES

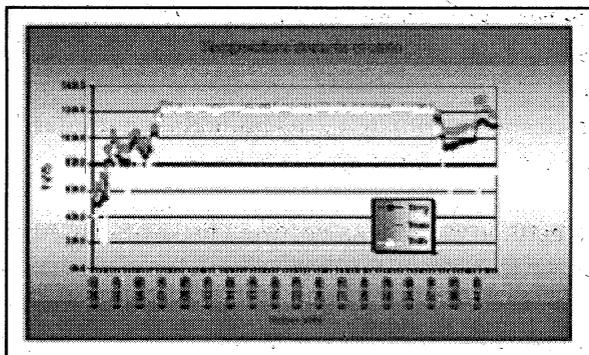
La prueba de hermeticidad se realizó de un día para otro dejándolo en vacío durante 12 horas, de lo cual se obtuvo una pérdida de presión de 1psi.

Los estudios de distribución de temperatura con cámara vacía, se realizaron con un ciclo identificado como F3, con una temperatura de 121 °C durante 30 minutos. Sus resultados aparecen en la tabla I, mientras que en la figura 1 se muestran los perfiles de temperatura. La duración promedio de las tres autoclavadas fue de 48 minutos.

**Tabla I**  
Distribución de temperatura con cámara vacía

CORRIDA	TEMPERATURA, (°C)		
	MÍNIMA	MEDIA	MAXIMA
1	122,7	123,0	123,4
2	122,6	122,9	123,3
3	122,5	122,8	123,2

Las diferencias entre las temperaturas máximas y mínimas, con respecto a la temperatura media no supera 0,5 °C.



**Figura 2.** Perfil de temperatura durante las corridas de distribución con la cámara vacía. Se observa la coincidencia de las tres curvas (T min, T med y T max) en la fase de exposición.

Una vez realizadas las autoclavadas requeridas para demostrar que el autoclave opera de acuerdo con las especificaciones del fabricante se realizaron las pruebas con carga.

El estudio de penetración de calor se realizó a un patrón de carga formado por un paquete de tapones en papel grado médico ubicado en el primer nivel de la cámara y dos paquetes con uniformes antifluidos. En las tres corridas se obtuvieron valores de Fo superiores a 24 minutos, de acuerdo con el criterio aplicado. El ciclo empleado se identificó como F3, con una temperatura de 121 °C durante 25 minutos.

La tabla II expone los resultados obtenidos mostrando los valores mínimos y máximos de Fo obtenidos en cada corrida.

CORRIDAS	VALOR DE Fo (minutos)	
	Fo mín.	Fo máx.
1	33,4	38,7
2	34,4	44,2
3	32,6	36,1

El criterio asumido fue realizar un proceso de esterilización que permitiera obtener un Fo > 24 minutos.

Los indicadores sometidos a la esterilización y los empleados como controles positivos fueron incubados en las condiciones recomendadas, 58 °C durante 48 horas.

Ninguno de los indicadores biológicos sometidos al proceso mostró evidencia de crecimiento; mientras que los controles positivos evidenciaron un cambio de coloración como signo del crecimiento microbiano.

Los indicadores químicos de barra móvil demostraron la actividad inmediata de los ciclo al estar la barra oscura en la posición “accepted”.

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba de hermeticidad o también llamada por la NTC 4954 como tasa de fuga, indicaron que la cámara es hermética, lo cual, aunque no tiene marcada influencia en el comportamiento térmico, es un aspecto de suma importancia en la etapa de postratamiento pues es en ésta en la cual generalmente se realiza un pulso de vacío prolongado, para extraer la humedad residual, en los procesos de esterilización para cargas sólidas.

La tabla I indica que la cámara del esterilizador es homogénea pues las diferencias entre los valores mínimos con respecto a la media es inferior a 1 °C; de igual forma la diferencia entre los valores máximos y la media es menor que 1 °C (NTC 4954).

De aquí se infiere que cualquier comportamiento anómalo del perfil de temperatura, en la carga, se debe a la configuración de ésta y no al desempeño del esterilizador. En la figura 1 se observan las tres curvas correspondientes a las temperaturas mínimas, máximas y media durante todo el ciclo. Durante las fases de pre y postratamiento los valores de temperatura se diferencian notablemente, lo cual es de esperar, debido a que los pulsos

de inyección de vapor y de vacío no permiten el establecimiento de condiciones estables. Una vez que se inicia la fase de exposición las variaciones de la presión del vapor saturado son muy pequeñas, lo que trae como consecuencia que las temperaturas en todos los puntos de la cámara estén próximas.

Se debe destacar que el sistema de control de esta autoclave, por diseño del fabricante, asume siempre 1°C por encima del valor de consigna fijado, como una garantía de que en un peor caso el punto más frío nunca estará por debajo de éste.

Las pruebas de desafío microbiológico, ejecutadas simultáneamente, con el estudio de penetración de calor, dieron como resultado que los bioindicadores recibieron una cantidad de calor suficiente para eliminar las esporas de *B. stearothermophilus* brindando un criterio biológico de la efectividad del proceso de esterilización.

## 5. CONCLUSIONES

El control de las variables de temperatura, presión y fugas en accesorios de un proceso de esterilización garantiza que la ejecución del ciclo se efectúe siempre de la misma forma, asegurando la consistencia, reproducibilidad y trazabilidad de los resultados. Este aspecto constituye un elemento fundamental en la obtención de productos farmacéuticos e industriales.

Los estudios previos con la cámara vacía demostraron que el sistema tiene un comportamiento muy homogéneo durante la fase de exposición del ciclo de esterilización, con diferencias inferiores a 0.5 °C, lo cual favorece el desempeño del proceso.

La medición y registro de los perfiles de temperatura, durante la ejecución del ciclo de esterilización, así como el cálculo simultáneo de los valores de  $F_0$  y el desafío microbiológico con esporas de

*B. Stearothermophilus* constituyen un método adecuado para demostrar la efectividad de los patronamientos realizados a los instrumentos y accesorios usados para la fabricación y ensamble de esterilizadores a vapor saturado.

Los valores de  $F_0$  que se obtuvieron en cada uno de los puntos estudiados, indicaron que el proceso brindó suficiente letalidad para eliminar las formas de vida microbiana potencialmente presentes en los materiales que conformaron el patrón de carga.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Denyer, S. and Baird, R. (1990). Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals. Ed. Ellis Horwood.
- [2] Enzinger, R.M. and Frieben, W.R. (1993). "An Overview of Aseptic Processing versus Terminal Sterilization". Sterilization of Medical Products. Vol. 6, 89-96.
- [3] Groves, M.J. and Murty, R. (1995). Aseptic Pharmaceutical Manufacturing II. Interpharm Press.
- [4] McBride, R.J. (1993). "The  $F_0$  Concept". Tutorial No. 1, Parenteral Society (pp. 3-15).
- [5] Nordhauser, F.M. and Olson, W.P. (1998) Sterilization of Drugs and Devices. Interpharm Press.
- [6] Parenteral Drug Association, European Forum. (1999). Steam Sterilization & Parametric Release - Science and Regulation.
- [7] Parenteral Drug Association. (2000). "Moist Heat Sterilization In Autoclaves Cycle Development - Validation and Routine Operation". PDA Technical Report (1), 2-17.