

Esterilización mediante vapor saturado de una lavadora de tapones, en una instalación de procesamiento aséptico

Jorge A. Padrón, Gerardo Limia, Camilo Gandolff, Orlando Martínez, María E. Reyes, Reyán Valdés, María E. Pardo,** Mara de Armas** y Fortuna Sánchez.****

Grupo Nacional de Validación, Avenida 27 No. 19805 entre 198 y 202, La Lisa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana.

*Centro Nacional de Biopreparados, Carretera Beltrán, km 1, Bejucal, Apartado Postal 6048, Habana 6, La Habana, Cuba.

Recibido: 22 de enero de 2002. Aceptado: 13 de marzo de 2002.

Palabras clave: esterilización, lavadora de tapones, esterilización de tapones, validación, perfil de temperatura, penetración de calor, reto microbiológico.
Key words: sterilization, stopper washer, stopper sterilization, validation, temperature profile, heat penetration, microbiological challenge.

RESUMEN. Se describe el estudio del proceso de esterilización, por calor húmedo, que se ejecuta en una lavadora de tapones para bulbos. Para lograr este objetivo se diseñó y aplicó un protocolo de validación que requirió la ejecución de varias corridas experimentales, bajo diferentes condiciones de operación y en las cuales se registraron los perfiles de temperatura y de presión, durante todo el ciclo. Como parte del estudio se incluyó un reto con indicadores biológicos, empleando esporas de *B.stearothermophilus*, para obtener un criterio microbiológico de la efectividad del proceso, además del criterio de un parámetro físico como la temperatura. El concepto de tiempo equivalente, Fo, fue definido y analizado y se examinó su aplicación en la comparación de procesos de esterilización y en la evaluación de la efectividad de un proceso de esterilización. Se observó que la distribución de temperatura es más homogénea con la cámara vacía que cuando esta contiene el patrón de carga estudiado, coincidiendo con lo que ha sido reportado. Se demostró además, que un programa de esterilización de 20 min a 121 °C, empleando vapor saturado como agente esterilizante, es efectivo para eliminar cualquier forma de vida microbiana. El control automático de todas las etapas de los ciclos de esterilización, aseguró la consistencia y reproducibilidad de los resultados. La medición de los perfiles de temperatura, el cálculo de Fo y el desafío microbiológico constituyen un método apropiado para demostrar la efectividad de un proceso de esterilización.

ABSTRACT. The study of the sterilization process, by means of moist heat, which is effective method to execute this operation in a stopper washer for bulbs is described. To achieve this objective a protocol was designed and applied, requiring the execution of several experimental runs, under different operation conditions. The profiles of temperature and pressure, during the whole cycle was recording. As part of the study a challenge with biological indicators was included, using spores of *B.stearothermophilus*, in order to obtain an microbiological approach of the effectiveness of the process, besides the approach of a physical parameter as the temperature. The concept of equivalent time, Fo, was defined and analyzed and its application was examined in the comparison of sterilization processes, including the evaluation of the effectiveness of a sterilization process. It was observed that the distribution of temperature is more homogeneous with the empty chamber than the load chamber, coinciding with that reported in the literature, and being demonstrated that a sterilization program of 20 min to 121 °C, using saturated vapor as sterilizing agent, it is effective to eliminate any form of microbial life. The automatic control of all the stages of the sterilization cycles, assured the consistency and reproducibility of the results. The measurement of temperature profiles, Fo calculation and microbiological challenge, is a reliable method to demonstrate the sterilization process effectiveness.

INTRODUCCION

En la fabricación de productos farmacéuticos que no pueden ser esterilizados mediante un proceso de esterilización terminal, debido a su sensibilidad al calor, las operaciones de manipulación de los productos intermedios, el producto final y aquellos dispositivos y accesorios que están en contacto directo con estos, son consideradas etapas críticas y particularmente las operaciones que deben ejecutarse en condiciones asépticas, así como los procesos de esterilización.^{1,2,13} Durante las operaciones de llenado aséptico, además de mantener la esterilidad requerida, debe tenerse en cuenta que al producto farmacéutico no pueden incorporarse sustancias o partículas contaminantes que afecten su calidad.

En la producción de medicamentos parenterales de pequeño volumen, como es el caso de las vacunas, el contenedor final generalmente es un bulbo de vidrio borosilicado, clase hidrolítica I, cerrado con un tapón de clorobutilo. Estas dos partes están en contacto directo con el producto, desde la etapa del llenado aséptico y durante su almacenamiento posterior hasta su uso por lo cual no pueden degradar la calidad del fármaco.

El procesamiento de los tapones se realiza en un equipo que posee un diseño apropiado para garantizar que las operaciones de lavado, enjuagado, adición de silicona, es-

sterilización y secado se ejecuten adecuadamente, de forma automática, con una intervención mínima por parte del operador.⁹ El equipo utiliza el principio de separación física, agrupando los tapones en cestas independientes para reducir el choque mecánico entre ellos y al mismo tiempo, esterilizar y secar todas sus superficies.^{9,12}

La eficiencia de un proceso de esterilización, mediante el empleo de calor húmedo, es principalmente una función de la temperatura del vapor saturado^{3,4} y del tiempo de exposición, lo cual implica que diferentes combinaciones de temperatura y tiempo pueden lograr un resultado satisfactorio.^{6,7}

Es importante destacar que en este método es extraordinariamente importante el contacto físico entre el medio esterilizante y el objeto que se pretende esterilizar, pues el efecto térmico se produce debido al cambio de fase de vapor saturado a líquido.

La bibliografía especializada plantea que una exposición a 121,1 °C, durante 15 min debe ser capaz de eliminar cualquier forma de vida microbiana resistente al calor, incluyendo las formas esporuladas.^{2,3,6,7} La comparación de diferentes procesos de esterilización entre sí, con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura se realiza utilizando un término que se nombra tiempo equivalente y se identifica como F, cuyo valor se expresa en minutos.

Si durante un ciclo de esterilización es registrado el perfil de temperatura, simultáneamente se evalúa el valor de F en varias posiciones y en el punto de menor valor de F este tiempo es suficiente, para alcanzar el nivel de esterilización deseado, entonces se puede asegurar que el ciclo de esterilización proporciona el calor necesario a toda la carga.^{3,13}

El objetivo del trabajo fue la aplicación de un método que permite estudiar el proceso de esterilización en una lavadora de tapones, mediante el registro de los perfiles de temperatura durante la ejecución de los ciclos, en diferentes puntos del sistema.

MATERIALES Y METODOS

El estudio de los procesos de esterilización requiere no solo de la medición de los perfiles de temperatura, de forma concurrente en tiempo real, sino también, de un reto o desafío con un microorganismo cuyos parámetros de resistencia

al calor sean conocidos y cuantificables. En el caso de los procesos de esterilización por vapor saturado los parámetros que caracterizan a un bioindicador se denominan D y Z.³ 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 (L) y por tanto, de tiempo equivalente (F).

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

$$F = \int_{t_1}^{t_2} L dt$$

El valor F se define como el tiempo equivalente durante el cual un objeto ha sido sometido a una temperatura de esterilización determinada, tomando en cuenta la duración del ciclo, las temperaturas alcanzadas y el valor Z. En el concepto está implícito que este tiempo es diferente al tiempo real.^{2,3,6,7} En términos prácticos la expresión anterior es aplicada en la forma siguiente:

$$F = \Delta t \sum 10^{\frac{(T - T_b)}{Z}}$$

donde:

F tiempo equivalente (min, Fo en procesos de esterilización por vapor saturado).

T temperatura real en cualquier instante (°C).

Tb temperatura base (121,1 °C).

Z 10 °C (en procesos de esterilización por vapor saturado).

Dt tiempo (min).

En las corridas experimentales se estudiaron los tapones de 13 mm debido a que constituyen lo que se conoce como un "peor caso".⁹ Este criterio parte de estudios anteriores en los cuales se confirmó que si los tapones son más pequeños dificultan las operaciones de lavado y esterilización por tener más área.

Cada estudio consistió en tres corridas experimentales consecutivas, en las cuales se registró el perfil de temperaturas y se calcularon los valores de Fo acumulado de manera automática, por el programa empleado. De acuerdo con el criterio de aceptación, se intentó demos-

trar que el proceso de esterilización fuera capaz de suministrar a la carga un Fo ≥ 15 min, en el punto más frío.

Se empleó un sistema de adquisición de datos formado por una microcomputadora IBM compatible, para el almacenamiento de los valores de temperatura, presión y tiempo, así como el cálculo de Fo, un sistema de medición Kaye, modelo Portable Validator con dos bancos de 16 canales de temperatura y un canal de presión y el programa "Validator" Ver. 1.09, que opera conjuntamente con el hardware del sistema para la adquisición de datos en tiempo real.

El sistema de medición de temperatura fue calibrado en tres puntos (100, 121 y 140 °C) antes del inicio de los estudios y luego periódicamente, con el objetivo de asegurar que las mediciones de temperatura tuvieran un error inferior a 0,5 °C.^{5,7,14} En la práctica se observó que las diferencias entre los termopares y la sonda patrón fueron inferiores a 0,25 °C.

El estudio fue realizado en una lavadora de tapones ICOS Impianti, modelo LST-80, equipo diseñado fundamentalmente para realizar los procesos de lavado, enjuagado, esterilización y secado de los tapones. Al finalizar estos procesos, los tapones quedan listos para ser utilizados en el proceso de llenado aséptico. Todas las operaciones fueron ejecutadas y verificadas por un controlador programable y una computadora que supervisa el estado y los parámetros del proceso.¹¹ El registro de las señales de estado se dirige a una impresora y a un registrador analógico digital.

PARTE EXPERIMENTAL

Se introdujo en la cámara el haz de termopares, previamente calibrados, por el puerto de acceso; una vez dentro, se colocó un termopar en cada una de las ocho cestas; otro se ubicó en el sensor de control y el último, en el drenaje de la lavadora, respectivamente. Se emplearon en total 10 termopares (Fig. 1).

En todos los estudios se utilizó el mismo programa (Tabla 1). Las etapas iniciales del ciclo (operaciones de lavado y enjuagado) se deshabilitaron, en el panel de control, para evitar daños a los termopares. Esto no influyó en los resultados del trabajo.

El ciclo 20 se ejecutó tres veces consecutivas, permitiendo un intervalo apropiado entre las corridas

con el objetivo de iniciar todas los ciclos a una temperatura similar, inferior a 60 °C. Se registraron los datos de temperatura en cada uno de los canales, con un intervalo de 30 s, así como la presión dentro de la cámara.

Posteriormente, mediante la operación manual del controlador PC Brain, se retiraron los termopares con cuidado y se colocó en las cestas la carga a estudiar constituida por tapones de 13 mm. Una vez cargada cada cesta, se colocó nuevamente el termopar correspon-

diente y mediante un dispositivo, se fijó un indicador biológico, quedando este insertado dentro de la masa de tapones. Para el reto microbiológico^{1-3,7} se emplearon esporas de *Bacillus stearothermophilus*, ATCC 7953, con una concentración de $1,8 \cdot 10^6$ UFC, Z = 12 °C y D = 1,5 min.

Se realizaron nuevamente tres corridas consecutivas con el ciclo No. 20. Al terminar cada una se sustituyeron los indicadores biológicos expuestos al proceso de esterilización por otros nuevos. Se registró la temperatura y se calculó el Fo

acumulado en cada uno de los canales y se registró también el perfil de la presión. Finalizadas todas las corridas, se identificaron adecuadamente los bioindicadores y se seleccionaron seis ampollitas como controles positivos.

Todos los indicadores biológicos expuestos al calor, más los tomados como controles positivos, fueron sometidos a un proceso de incubación durante 48 h a 58 °C, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El procesamiento de los resultados se realizó mediante el programa Validator y con una hoja de cálculo electrónica, calculando la temperatura media según la expresión [1], para la condición *Exposition Status* = 1, de acuerdo con los resultados obtenidos por el programa referido, mientras que la desviación estándar y el coeficiente de variación, se calcularon según las expresiones [2] y [3] respectivamente, en las mismas condiciones.

$$\bar{T} = \frac{\sum T_i}{n} \quad [1]$$

(aplicable solo si la fase de exposición está activada).

$$S = \sqrt{\frac{\sum (T - \bar{T})^2}{n}} \quad [2]$$

(aplicable solo si la fase de exposición está activada).

$$CV = \frac{S}{\bar{T}} \quad [3]$$

(aplicable solo si la fase de exposición está activada).

Durante la fase de exposición las condiciones de temperatura y presión del vapor saturado tienden a ser estables, además de ser precisamente la condición de operación del proceso, por lo cual es posible aplicar estas expresiones. En otras etapas del proceso, pre-tratamiento y post-tratamiento, las condiciones de presión y temperatura son variables por lo que un análisis de este tipo no es aplicable.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudios de distribución de temperatura con la cámara vacía

Los valores medios de temperatura, durante la fase de exposición, indican una gran homogeneidad no solo dentro de una misma corrida, sino también entre ellas (Tabla 2).

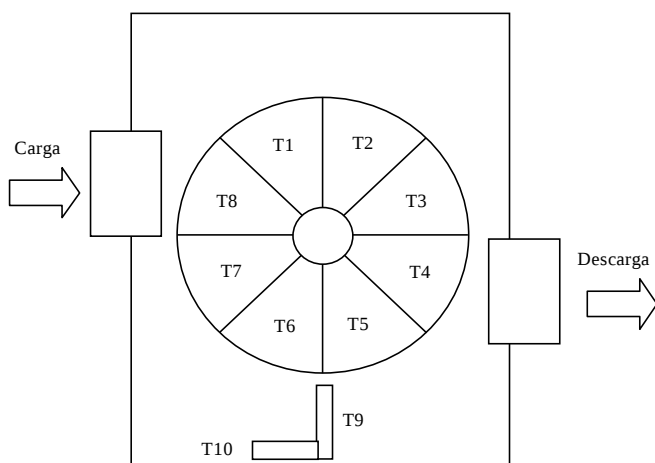


Fig. 1. Vista lateral de la lavadora LST-80.

Tabla 1. Parámetros de operación del ciclo de esterilización.

Parámetros	Configuración
Programa ID	20
Descripción	Stoppers Washing, Rinsing, Sterilizing & Drying
Pulsos de vacío	3
Temperatura (°C)	121,5
Tiempo (min)	20

Tabla 2. Distribución de temperatura promedio con la cámara vacía en la fase de exposición.

Termopar	Temperaturas (°C)		
	Corridas		
	1	2	3
T1	123,5	123,4	123,3
T2	123,3	123,3	123,2
T3	123,4	123,4	123,3
T4	123,4	123,3	123,3
T5	123,4	123,4	123,3
T6	123,3	123,3	123,2
T7	123,4	123,3	123,3
T8	123,5	123,4	123,4
T9	123,4	123,3	123,2
T10	123,4	123,3	123,3

Las diferencias entre las temperaturas máxima, media y mínima, están muy próximas entre sí en cada una de las tres corridas, lo cual indica que existe consistencia en la ejecución de los ciclos. Al calcular la relación existente entre la desviación estándar y la media aritmética de los datos de temperatura, se encontraron valores entre 0,036 y 0,039 para el coeficiente de variación (CV), lo cual implica que la dispersión de las temperaturas, durante la fase de exposición es estrecha (Tabla 3).

Las diferencias entre las temperaturas máxima y media con respecto a la promedio muestran diferencias inferiores a 0,5 °C, lo cual indica que la cámara es muy homogénea, condición que favorece el desempeño de los procesos de esterilización.

Este comportamiento se debe, entre otros factores, al apropiado diseño de la cámara de la lavadora de tapones, a su sistema de control automático y a la estabilidad de los servicios auxiliares.

Estudios de penetración del calor en la carga

Al realizar las corridas con la cámara cargada se observó también homogeneidad en las temperaturas, durante la fase de exposición, a pesar de la presencia de un patrón de carga (Tabla 4).

La diferencia entre las temperaturas promedio de cada corrida fueron inferiores a 0,3 °C y el coeficiente de variación no superó 0,1, por lo que es posible afirmar que el patrón de carga estudiado no afecta el desempeño de la lavadora de tapones, durante los procesos de esterilización (Tabla 5).

Aunque se reportan los diez canales de temperatura, en el análisis de penetración del calor se deben considerar principalmente los termopares T1 a T8, debido a que son los que muestran el efecto del medio esterilizante (vapor saturado) en la carga. Los resultados más interesantes de esta prueba recaen en los Fo obtenidos, (Tabla 6), debido a que con 20 min de exposición se lograron valores muy superiores a los 15 min impuestos por el criterio de aceptación. En ella se observa que el valor mínimo de Fo obtenido fue de 33,7 min, en la corrida número 2, termopar T4. Este valor supera en más de dos veces el criterio de aceptación.

El ciclo configurado para 20 min de esterilización a 121,5 °C aporta suficiente cantidad de calor a los

Tabla 3. Resumen de la distribución de temperatura con la cámara vacía.

Valor	Temperaturas (°C)		
	Corridas		
	1	2	3
Mínimo	123,3	123,3	123,2
Promedio	123,4	123,4	123,3
Máximo	123,5	123,4	123,4
CV	0,039	0,036	0,039

Tabla 4. Distribución de temperatura con la cámara cargada.

Termopar	Temperaturas (°C)		
	Corridas		
	1	2	3
T1	123,5	123,3	123,3
T2	123,5	123,3	123,3
T3	123,2	123,1	123,1
T4	123,3	123,1	123,1
T5	123,5	123,3	123,3
T6	123,5	123,3	123,3
T7	123,6	123,3	123,3
T8	123,4	123,2	123,2
T9	123,5	123,2	123,2
T10	123,5	123,2	123,2

Tabla 5. Resumen de la distribución de temperatura con la cámara cargada.

Valor	Temperaturas (°C)		
	Corridas		
	1	2	3
Mínimo	123,2	123,1	123,1
Promedio	123,5	123,2	123,2
Máximo	123,6	123,3	123,4
CV	0,090 4	0,071 5	0,081 5

Tabla 6. Distribución de Fo acumulado con la cámara cargada.

Termopar	Valor de F acumulado (min)		
	Corridas		
	1	2	3
T1	37,6	36,2	34,8
T2	37,9	36,5	36,4
T3	35,5	34,8	34,7
T4	35,9	34,2	33,7
T5	37,8	36,0	34,6
T6	37,5	35,9	34,6
T7	38,3	36,6	35,5
T8	37,0	35,8	35,2
T9	37,3	35,5	34,1
T10	37,4	35,5	34,5

tapones de 13 mm que se emplearon como patrón de carga.

Reto microbiológico

El reto microbiológico se realizó simultáneamente con los estudios de penetración. Después de 48 h de incubación, no se observó evidencia de crecimiento en los indicadores biológicos que fueron sometidos al proceso de esterilización lo cual es una indicación de que recibieron suficiente cantidad de calor para eliminar las esporas; sin embargo, los controles positivos incubados en iguales condiciones (58 °C - 48 h), mostraron un notable cambio de coloración, evidenciando el crecimiento de formas vegetativas.

CONCLUSIONES

Los compartimentos de la tambora de la lavadora de tapones muestran 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.

En todas las cestas o compartimentos, el valor de Fo que se alcanza garantiza letalidad suficiente para eliminar cualquier forma de vida microbiana presente en los tapones, lo cual fue verificado me-

dante la medición de un parámetro físico (temperatura) y el reto con indicadores biológicos.

El control automático, de todos los pasos de un proceso de esterilización, asegura que la ejecución del ciclo, se efectúe siempre de la misma forma garantizando la consistencia y reproducibilidad de los resultados.

La medición de los perfiles de temperatura en cada punto estudiado, el cálculo simultáneo del Fo acumulado, así como el desafío microbiológico con esporas de *B. stearothermophilus* constituyen un método apropiado para demostrar la efectividad del proceso de esterilización, en el equipo estudiado.

BIBLIOGRAFIA

1. Clontz L., Microbial Limits and Bioburden Test - Validation Approach and Global Requirements, InterPharm Press Inc., 5-31, USA, 1998.
2. Nordhauser F.M., Olson W.P., Sterilization of Drugs and Devices, InterPharm Press Inc., Ch. 2, 5-43, USA, 1998.
3. Parenteral Drug Association. Moist Heat Sterilization in Autoclaves, Technical Monograph No. 1, Draft No. 10, 32-54, USA, 2000.
4. Keenan J.H., Keyes F.G., Steam Tables - Thermodynamics properties of water including vapor, liquid and solid phases, 10-62, Wiley-InterScience, USA, 1978.

5. Kaye Inc., The Validator, User Guide, 8-57, USA, 1997.
6. Pflug I.J. Discussion of the Z-value to use in calculating the F₀-value for high-temperature sterilization processes. **Journal of Parenteral Science and Technology**, 50, 51-54, USA, 1996.
7. Parenteral Drug Association, European Forum, Steam Sterilization & Parametric Release Science and Regulation, Sterilizing by Moist Heat, 1-15, Switzerland, 1999.
8. DeSpautz J.F., Quantifying the benefits of automation, **Pharmaceutical Engineering**, 20, 44-60, USA, 2000.
9. ICOS Impianti LST-80, Validation Handbook, 11-36, Italia, 1996.
10. Hannon F., Westermann D.H., Design requirements in a multi-product manufacturing facility. **Pharmaceutical Engineering**, 18, 72-78, USA, 1998.
11. Sigvardson K., Manalo J.A., Wasserman D., Laboratory Equipment Qualification. **Pharmaceutical Technology**, 25, 102-108, USA, 2001.
12. Roberge G.M., Factory Acceptance Testing of Pharmaceutical Equipment, **Pharmaceutical Engineering**, 20, 8-16, USA, 2000.
13. Enzinger R.M., Friebe W.R., An Overview of Aseptic Processing versus Terminal Sterilization, 4, 89-96, Sterilization of Medical Products. Polyscience Publication Inc., Canada, 1993.
14. Temperature Measurement in Engineering, Volume 2, 3-32, Baker H.D., Ryder E.A. Omega Press, USA, 1975.



ACTIVIDADES CIENTÍFICAS

MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

V ENCUESTRO IBEROAMERICANO SOBRE LAS CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS

Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana

Del 15 al 17 de octubre del 2002.

TEMATICAS: *Diseño curricular en las carreras de ciencias farmacéuticas y alimentarias.*

Enseñanza de postgrado en ciencias farmacéuticas y alimentarias. Atención farmacéutica. Farmacología y farmacocinética. Toxicología. Tecnología farmacéutica y cosmética, diseño de nuevas formas farmacéuticas. Aseguramiento de la calidad en la actividad farmacéutica. Análisis farmacéutico. Productos naturales, plantas medicinales y medicina tradicional. Química farmacéutica y síntesis de medicamentos. Ciencia y tecnología de procesos biotecnológicos. Microbiología y calidad sanitaria de los alimentos. Ciencia y tecnología de alimentos. Alimentación y nutrición.

MODALIDADES: *Conferencias, mesas redondas, talleres y posters.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 150.00 USD. *Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.*

SEDE: Palacio de las Convenciones de La Habana

COMITE ORGANIZADOR: Dr. Oscar Ros López, E-mail: ifal@mailier.pco.cu Fax: (537) 33-6811