

Eliminación de endotoxinas presentes en la cristalería utilizada en la preparación de disoluciones parenterales, por calor seco

Jorge Fernández, Jorge A. Padrón, Laritza Carballosa, Lissette Luis y Gerardo Límia.

Grupo Nacional de Validación, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros, Instituto FINLAY, Avenida 27 No. 19805, La Lisa, Zona Postal 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de abril del 2000. Aceptado: 28 de junio del 2001.

Palabras clave: despirogenización, horno, calor seco, endotoxina bacteriana, validación.
Key words: depyrogenation, ovens, dry heat, bacterial endotoxin, validation.

RESUMEN. Los ciclos de despirogenización por calor seco se realizan generalmente a temperaturas mucho mayores a las empleadas en la esterilización por vapor y en exposiciones más prolongadas. Este es uno de los procesos de mayor consumo energético y de los más empleados para eliminar las endotoxinas bacterianas presentes en los materiales de laboratorio de las industrias Médico-farmacéutica y Biotecnológica. Se realizó un estudio, para determinar si era factible la reducción de la temperatura del proceso y su duración. Esto permitiría además, una reducción del tiempo total del procesamiento y como consecuencia, una disminución del consumo de energía eléctrica. Con este fin, se estudió la despirogenización en dos modelos de hornos Memmert (800 y ULP500) muy utilizados en laboratorios y centros de la industria Médico-farmacéutica. Se determinó la distribución de la temperatura en los hornos. Se realizó un ciclo con los parámetros que se ajustaban para estos ciclos: 250 °C en el modelo 800 y 280 °C para el ULP 500 con un tiempo de exposición de 60 y 30 min respectivamente. Se determinaron las zonas más frías del horno. En esta zona se concentró el estudio con endotoxinas bacterianas, se ejecutaron tres ciclos introduciendo recipientes con aproximadamente 10 000 unidades de endotoxinas/mL, concentración que constituye un reto para el proceso. Se registraron las mediciones de temperatura mediante termopares, se calculó el F_H y se determinó la cantidad de endotoxinas remanente. En ambos casos, se logró reducir la temperatura del ciclo y su duración. Los estudios demostraron que a temperaturas y duración menores es posible disminuir tres log o más la concentración inicial de endotoxinas bacterianas. Estos estudios pueden contribuir a una disminución apreciable del consumo energético al realizar estas operaciones y a una mayor utilización de estos equipos.

ABSTRACT. The depyrogenation cycles by dry heat are generally carried out at temperatures much higher than those used in the sterilization by saturated steam and with longer exposition times. This is one of the processes of more energy consumption and one of the most popular ones used to eliminate the bacterial endotoxins present in the laboratory materials of the pharmaceutical, biotechnological and medical-devices industries. For this reason it was carried out this study to determine if it was feasible the reduction of the temperature of the process and its duration. This would also allow a reduction of the total processing time and therefore a decrease of the energy consumption. For this purpose, the depyrogenation process was studied in two models of ovens manufactured by Memmert and frequently used in laboratories: I model 800 and I model ULP500. The temperature distribution was determined in the ovens. It was carried out a cycle with the original parameters used for the cycle, 250 °C in the model 800 and 280 °C for the ULP 500 with exposition times of 60 and 30 min . respectively. The coldest areas in the oven were determined. In these zones the study with bacterial endotoxins was concentrated, three cycles were run introducing recipients with nearly 10 000 endotoxin units/mL; this concentration constitutes a challenge for the process. Temperature measurements were registered by means of thermocouples,

the F_H was calculated and the remaining amount of endotoxins was determined. In both cases it was possible to reduce the temperature of the cycles and their duration. The studies demonstrated that at lower temperatures and lesser durations it is possible to reduce three logs or more, the initial concentration of bacterial endotoxins. These studies can contribute to an remarkable decrease of the energy consumption when carrying out these operations, and to a bigger use of this equipment.

INTRODUCCION

El calor seco es utilizado en las Industrias Médico-farmacéutica y Biotecnológica, unas veces como método de esterilización y en otras ocasiones, además, como forma de despirogenización.¹ La despirogenización es la remoción o destrucción de pirógenos, particularmente de las endotoxinas.² Las endotoxinas bacterianas forman parte de la pared celular de las bacterias gram negativas.³⁻⁶ Algunos autores plantean que para su destrucción, los ciclos de despirogenización por calor seco deben realizarse a una temperatura no menor de 250 °C,^{7,8} no menos de 30 min,⁸ mientras otras recomiendan utilizar para esterilización y despirogenización, temperaturas mayores de 220 °C.³ La tendencia actual no se encamina a buscar tiempos y temperaturas adecuados, sino a lograr un acumulado de F_H suficiente para reducir la cantidad de endotoxinas 1 000 veces o más. El ciclo de despirogenización se considera exitoso, si se logran al menos tres logaritmos

de reducción de la concentración inicial de las endotoxinas presentes en los artículos a despirogenizar.^{1,7,8}

Los materiales que se intentan despirogenizar, principalmente frascos de vidrio o utensilios de todo tipo, capaces de resistir elevadas temperaturas,⁴ son introducidos en hornos que utilizan, como medio de transmisión del calor, aire suministrado a través de filtros HEPA.^{7,9}

La colocación de la carga en el horno influye en la distribución de temperaturas dentro de la cámara, por lo que para una correcta ubicación se hace necesario realizar estudios de distribución de temperatura durante la ejecución de los ciclos de despirogenización.¹ Estos estudios forman parte de la validación de ese proceso.

Un ciclo completo consume gran cantidad de tiempo y energía eléctrica por lo que es considerable el ahorro de recursos cuando se ejecuta a temperaturas y tiempos de duración menores, obteniendo los mismos resultados.

Se estudió el proceso de despirogenización en dos modelos de hornos Memmert, escogidos sobre la base de estudios de validación preliminares, con el objetivo de determinar si era factible la reducción de la temperatura del proceso y su duración. Esto permitiría una reducción del tiempo total de procesamiento y por ende, una disminución del consumo de energía eléctrica.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en dos modelos de hornos por ser equipos muy empleados en los procesos de despirogenización; los equipos fueron: Horno Memmert modelo 800 (gran volumen de procesamiento y lentitud en alcanzar la temperatura de operación y en disminuir la temperatura de la carga una vez terminado el proceso) y Horno Memmert modelo ULP500 (pequeño volumen de procesamiento).

El material a despirogenizar (carga) consistió en frascos de cristal, dispuestos siempre de igual forma, garantizando la uniformidad de los procesos. Se llama carga máxima a la disposición que incluye la mayor cantidad de material y carga mínima a la de menor cantidad. La temperatura del horno modelo 800 fue ajustada a 250 °C y una duración del ciclo de 1 h, mientras el otro modelo se ajustó a 280 °C y 30 min.

La duración del ciclo comienza a contarse desde el momento en que el sensor de temperatura del horno

alcanza la temperatura ajustada y no representa sino una parte de la duración total del ciclo, el cual termina cuando la temperatura de los objetos sometidos a la despirogenización alcanza una magnitud que permite su manipulación sin riesgo para el operador.

Para las mediciones de temperatura se empleó el sistema de registro de temperaturas, compuesto de un sistema de medición Marca Kaye, modelo Portable Validator, X1310CE, una sonda inteligente de medición de temperatura, Modelo M2801/IRTD-400 y un calibrador de temperatura modelo HTR-400 (Kaye, USA). En ambos hornos primeramente, se determinó la *distribución de temperatura* con la cámara vacía, introduciendo termopares tipo T, con forro de kapton, en las distintas partes de la cámara; de esta forma, se deter-

minaron los puntos más fríos. Posteriormente, se estudió la *penetración del calor* con las cargas predefinidas (Fig. 1). De este estudio se seleccionaron los puntos más fríos dentro de la carga y se colocaron en ellos recipientes con 0,1 mL de un control estándar de endotoxina (CSE) de *Escherichia coli* a 10 000 unidades de endotoxina por mililitro, (UE/mL) lo que constituyen los recipientes de reto.

Seis de estos recipientes no se sometieron al proceso y se consideraron como controles positivos. Para la determinación de la cantidad de endotoxina antes y después del proceso de despirogenización, se utilizó el método cromogénico cuantitativo cinético LAL (Limulus Amebocyte Lisate) con 0,005 UE/mL y un juego de reactivos Chromogenix (Suecia)³. La reducción debe ser

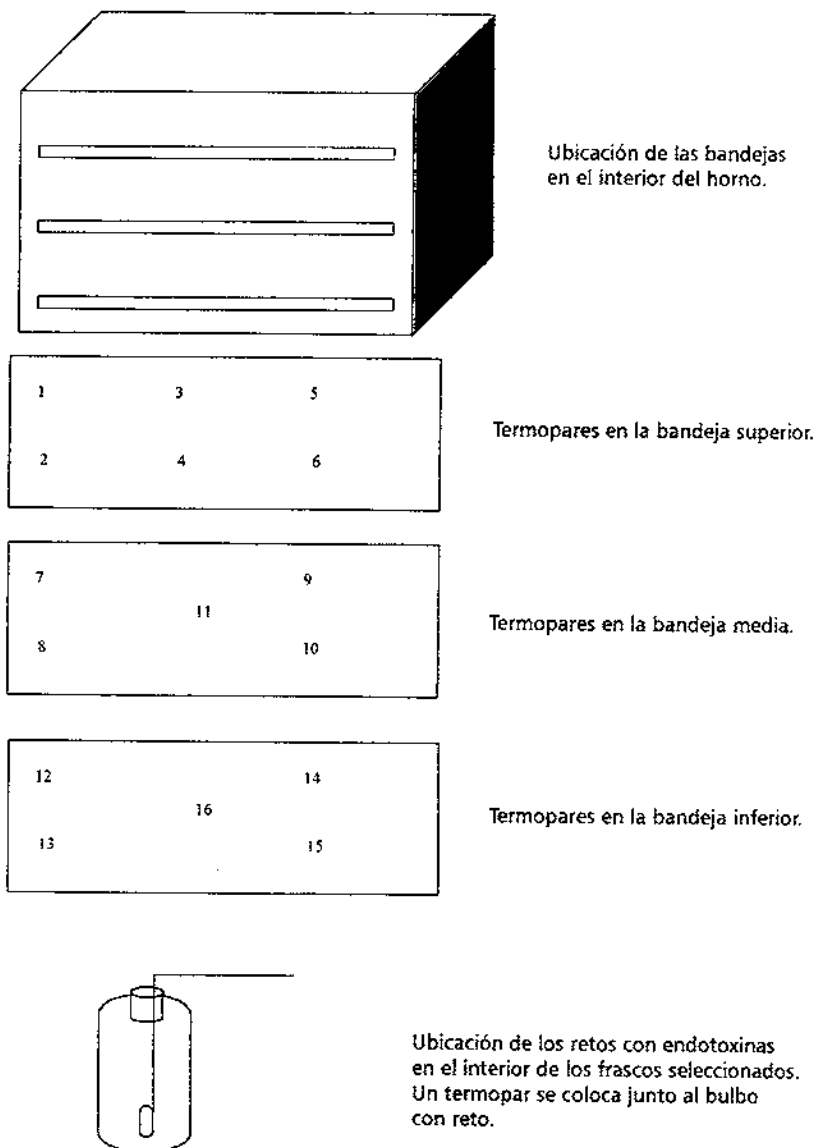


Fig. 1. Diagrama de colocación de termopares en la cámara vacía.

igual o mayor a tres log,⁴ lo que se determina utilizando la expresión siguiente:

$$N = \log \frac{C_f}{C_i}$$

donde:

N número de reducciones logarítmicas.

Cf concentración final (remanente).

Ci concentración inicial (controles positivos).

Tanto los estudios de penetración de calor como las corridas con endotoxinas, se realizaron por triplicado.

La calibración de los termopares se realizó automáticamente mediante el programa del Kaye Validator, versión 1,05 (Kaye, USA). Los termopares tuvieron una diferencia con las indicaciones del termómetro patrón no mayor de 0,2 °C.

Los parámetros que se estudiaron fueron la cantidad de calor recibida por los objetos y la reducción de endotoxinas alcanzada.

La cantidad de calor recibida se determinó mediante sensores de temperatura ubicados en distintos objetos sometidos al proceso. Esta variable se registró a intervalos iguales de tiempo. Para expresar esta cantidad de calor en términos equivalentes a la temperatura fijada se utiliza la fórmula siguiente:¹

$$F_H = \sum 10^{\frac{T_{med.} - T_{ref.}}{Z}} \Delta t$$

donde:

F_H tiempo equivalente a la temperatura de referencia.

T_{med.} temperatura registrada en cada medición.

T_{ref.} 250 °C, temperatura de referencia.

Z 54 °C, temperatura experimental.

Δt intervalo de tiempo en que se registran las mediciones (min).

El valor Z es encontrado experimentalmente en el estudio de destrucción de endotoxinas a la temperatura de 250 °C.

PARTE EXPERIMENTAL

Estudio del proceso de despirogenización en el Horno Memmert modelo 800

Se determinó la distribución de temperatura en la cámara vacía y seguidamente se estudió la penetración de calor introduciendo termopares en diferentes zonas de la carga.

Se realizó un ciclo con los parámetros originales que se ajustaban para el ciclo, es decir, una temperatura de 250 °C y un tiempo de

exposición de 60 min. Este estudio se realizó con las cargas mínima y máxima, por triplicado, para determinar los puntos más fríos; en los objetos colocados en esta zona, se concentró el estudio posterior.

Una vez analizados los resultados de estas corridas, se disminuyó la temperatura y el tiempo de exposición, calculando F_H, hasta obtener valores próximos a 10 min. Para estos últimos parámetros se ejecutaron nuevamente tres ciclos, introduciendo objetos con aproximadamente 10 000 UE/mL donde estaban los termopares que recibieron menor cantidad de calor según el estudio de penetración. Se registraron las mediciones, se calculó el F_H y se determinó la cantidad de endotoxinas remanente.

Estudio del proceso de despirogenización en un Horno Memmert modelo ULP500

Se realizó un ciclo con los parámetros originales que se ajustaban para el ciclo, es decir, una temperatura de 280 °C y un tiempo de exposición de 30 min. Este estudio se realizó en tres ciclos. Se estudiaron cuatro configuraciones de carga, mediante una corrida en cada una, a fin de determinar cuál de estas cargas era la que recibía menor cantidad de calor (peor caso).

Con la configuración de carga donde se obtuvo la menor F_H, se ejecutaron tres ciclos. Con este fin se introdujeron objetos con igual cantidad de reto (≈ 10 000 UE/mL) don-

de estaban los termopares que recibieron menor cantidad de calor según el estudio anterior (penetración de calor). Se registraron las mediciones, se calculó el F_H y se determinó la cantidad de endotoxinas remanente.

RESULTADOS Y DISCUSION
Horno Memmert modelo 800

En este horno además de las tres corridas de distribución de calor con la cámara vacía, se efectuaron estudios de penetración de calor con las cargas identificada como máxima y mínima (Tabla 1).

Aunque la temperatura establecida para el ciclo de despirogenización fue de 250 °C, la media real alcanzada fue superior a los 270 °C para ambas cargas, lo cual le confiere mayor seguridad al proceso. Los resultados de este estudio permitieron determinar que la zona más fría del horno, fue la bandeja superior en ambas configuraciones de carga.

La reducción de la temperatura del ciclo a 200 °C y del tiempo de exposición a 15 min disminuyó a 4 h la duración total del ciclo de despirogenización, con lo que se logró una adecuada reducción de las endotoxinas (Tablas 2 y 3).

Los F_H en las tres corridas con las cargas mínima y máxima, se encontraron entre 8 y 13 min y 10 y 11 min respectivamente. No se observó en esos intervalos, correlación directa alguna entre esos valores y las correspondientes reducciones logarítmicas.

Tabla 1. Temperaturas alcanzadas en los estudios de penetración de calor con las cargas mínima y máxima.

Carga	Temperatura (°C)			Diferencias	
	Mínima	Media	Máxima	Max. - Med.	Med. - Min.
Mínima	247,5	273,5	298,6	25,1	26,0
Máxima	251,4	273,1	305,8	32,7	21,7

Tabla 2. Resultados alcanzados en tres corridas con la carga mínima.

Termopar	Corrida					
	1		2		3	
	F _H (min)	N	F _H (min)	N	F _H (min)	N
1	13	> 7	9	> 7	8	3
2	11	> 7	8	5	8	3
3	11	6	8	> 7	8	3
4	11	6	8	4	8	4
5	11	5	8	4	8	5
6	11	> 7	8	4	8	4

Tabla 3. Resultados alcanzados en tres corridas con la carga máxima.

Termopar	Corrida					
	1		2		3	
	F _H (min)	N	F _H (min)	N	F _H (min)	N
1	10	7	10	4	10	5
2	10	4	10	3	10	3
3	10	3	10	3	10	3
4	10	7	10	3	11	3
5	11	5	10	> 7	11	3
6	10	4	10	5	11	3

Tabla 4. Resultados de las temperaturas alcanzadas en las tres corridas del estudio de distribución de calor.

Corrida	Temperatura (°C)			Duración del ciclo (h:mm:ss)
	Mínima	Media	Máxima	
1	274,7	280,4	284,8	3:38:18
2	276,6	280,7	283,9	3:32:18
3	276,9	280,8	284,2	3:47:12

Tabla 5. Valores de F_H y Número de reducciones logarítmicas obtenidas, con el peor caso.

Corrida	F _H (min)			Reducción (log)
	Mínimo	Medio	Máximo	
1	36,0	41,9	58,0	> 6
2	37,0	42,4	58,0	> 6
3	36,0	41,0	56,0	> 6

En ambos casos (carga mínima y máxima) la reducción logarítmica fue igual o mayor que tres. La concentración de endotoxina recuperada de los controles positivos resultó superior al 50 %, por lo que se tomaron como aceptables para estos propósitos.^{7,8,10}

Horno Memmert modelo ULP500

En este horno se realizaron tres corridas de distribución de calor, con la cámara vacía y posteriormente, se efectuó un estudio de penetración de calor con la carga identificada como "peor caso". La temperatura fue fijada en 280 °C durante 60 min (Tabla 4).

Pudo observarse que la temperatura media alcanzada en cada corrida resultó prácticamente la misma, lo que demostró una gran estabilidad en el comportamiento de este horno. La diferencia entre los valores mínimo y máximo y el valor medio, no excedió de 6 °C, cuando las especificaciones establecen ± 15 °C.¹¹

Los F_H obtenidos fueron superiores a los requeridos por este proceso, por lo que se decidió reducir la temperatura del ciclo a 250 °C y la duración a 15 min (Tabla 5).

Los resultados demuestran que la reducción del ciclo a 15 min a 250 °C, proporciona aún valores de F_H con un margen de seguridad muy elevado, pues la reducción esperada de endotoxinas debe ser de al menos tres logaritmos. La concentración de endotoxina recuperada de los controles positivos fue superior al 50 % por lo que se tomaron como aceptables para estos propósitos.^{7,8,10}

La duración del ciclo se reduce a 2:30 h como promedio. Esta variación del ciclo, permite superar una limitación que tenía este equipo, ya que por el poco volumen de la cámara, se hacía imposible despirogenizar todos los materiales que se necesitan para la preparación de un lote en un solo día.

CONCLUSIONES

Con el empleo de calor seco es posible llevar a cabo procesos de despirogenización confiables y consistentes, con menos tiempo de duración que los convencionales (250 °C durante 60 min). Valores de F_H alrededor de 10 min resultan suficientes para reducir la concentración de endotoxinas en tres logaritmos, por lo que es posible obtener un proceso exitoso con una disminución apreciable del costo energético.

Aunque este estudio no constituye una optimización del proceso, sin embargo demuestra que un ciclo de 7 h se limita a 4 h con lo que se logra el número de reducciones de endotoxinas esperado, mientras el segundo disminuye su duración hasta 2,5 h como promedio, sin afectar la capacidad de despirogenización del horno.

BIBLIOGRAFIA

1. Parenteral Drug Association, Inc. Pennsylvania, USA. Technical Monograph No. 3: Validation of Dry Heat Processes Used for Sterilization & Depyrogenation, 1981.
2. Michael E. Dawson, Depyrogenation, LAL UPDATE, 11, No. 5, Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts, 1993.
3. Pearson F.C. Pyrogens: Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation, USA, 1985.
4. Hecker W. Withaver y Staerk A. Validation of Dry Heat Inactivation of Bacterial Endotoxins. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 48, 22, 1994.
5. Cromogenix AB (Sweden) User's Manual: Coatest Gel-LAL, 1997.
6. Parenteral Drug Association Inc., Pennsylvania, USA. Report Tech. No. 7: Depyrogenation, 1985.
7. Pharmacopeial Convention. Inc. USP 23 NF 18. General Information/Sterilization and sterilization Assurance. <1211>, USA, 1995.
8. British Pharmacopeia Commission. British Pharmacopeia 1998. Vol. II, Appendix XVIII, The Stationary Office. United Kingdom, 264, A264-A267, 1998.
9. Carleton E.J., Agalloco J.P. Validation of aseptic Pharmaceutical Processes, Chapter XII, Marcel Dekker, Inc., New York, 1986.
10. Novitsky T. Validation Controls for Depyrogenation LAL UPDATE Associates of Cape Cod., Inc., Woods Hole, Massachusetts, 1986.
11. Berry I.R., Nash R.A. Pharmaceutical Process Validation, Chapter III. 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 45, 1993.