

## VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL FILTRO UTILIZADO EN APLICACIONES LÍQUIDAS

### Parte 1: Revisión

M.W. Jornitz, J.P. Agalloco, J.E. Akers, R.E. Madsen, y T.H. Meltzer

**NOTA:** Este artículo ha sido transcrito por la ABAC desde la Edición Argentina de *Pharmaceutical Technology*, N° 54, 2001.

*Los autores revisan varias pruebas de integridad y debaten acerca del momento en que deben realizarse y los propósitos que se persiguen al practicarlas, especialmente para detectar incompatibilidades sutiles entre filtros y líquidos. Definen la ubicación del punto de burbuja en términos de flujos de aire a través de filtros humedecidos, enumeran las imprecisiones del punto de burbuja, identifican la falta de homogeneidad del filtro y sus implicaciones prácticas y detallan las influencias de la anisotropía y del tamaño del filtro. Los autores llegan a la conclusión de que la identificación de un filtro "esterilizador" en base a una prueba de integridad ya no es suficiente para validar un procedimiento de filtración estéril.*

Para la elaboración de productos estériles para el cuidado de la salud se debe elegir entre dos formas: la primera es mediante la esterilización física del producto en su contenedor final, generalmente por calentamiento o radiación. La otra es por filtración, mediante la cual se elimina la contaminación del desarrollo del proceso, seguido del efluente esterilizado contenido en ambiente aséptico.

La práctica de la filtración estéril depende esencialmente de que los filtros que se utilicen tengan la identidad adecuada y las características de calidad que exigen las normas, las cuales se verifican con las pruebas de integridad (1,2). Las pruebas de integridad están indicadas en varias ocasiones durante el desarrollo de un proceso de filtración estéril.

De acuerdo con la norma de la FDA: Normalmente, la prueba de integridad del filtro se lleva a cabo luego de colocar el filtro y antes de su primer uso. Sin embargo, es más importante la prueba que se lleva a cabo luego de utilizar el filtro, con el objeto de detectar cualquier pérdida o perforación del filtro que pudiera haber ocurrido durante la filtración.

No siempre se sigue esta recomendación. Cuando se selecciona un filtro en particular, debe verificarse su identidad fuera de la caja, además de la etiqueta, cotejando el valor correspondiente a la prueba de integridad con el especificado por el fabricante. Debe verificarse la integridad del filtro y del equipo en el que se coloca, luego de acomodarlo en su alojamiento, aparte de hacer una verificación por separado o exteriormente.

No es inusual que el filtro se esterilice antes de su primer uso. La verificación de integridad debe realizarse si el filtro instalado es esterilizado con calor húmedo (vapor). La arquitectura de los poros puede alterarse con la liberación del estrés ocasionado por el calor. En su estado natural, las largas cadenas de polímeros que constituyen el filtro, existen en forma de espiral. El estrés, una consecuencia del agrandamiento de las cadenas de polímero durante el proceso de colocación de la membrana, queda encerrado en el filtro terminado, atrapado por una alta viscosidad a mediada que la membrana se solidifica. La disminución de la viscosidad del polímero con el calor producido en la esterilización, permite el movimiento de recomposición del espiral de las moléculas del polímero dilatadas hacia una configuración más estable. Durante el proceso de ajuste, algunos de los espacios entre segmentos (poros) entre las cadenas de polímeros pueden agrandarse aún cuando otros disminuyan su tamaño. El tamaño de los poros puede cambiar.

Finalmente, la verificación de integridad debe realizarse posteriormente a la filtración para asegurar que el filtro se mantuvo íntegro durante todo el proceso de filtración.

La práctica de las pruebas de integridad en filtros, antes y después del proceso de filtración se considera, generalmente, un requisito GMP (1)

Sin embargo, en algunas circunstancias se evita la verificación antes del proceso de filtración para minimizar los riesgos de asepsia implícitos en el proceso, ocasionados por invasiones del filtro cuando la prueba se lleva a cabo en forma manual. El uso de equipos automáticos para verificar la integridad, con capacidad para realizar la

prueba contra corriente, evita estas preocupaciones.

### • IDENTIFICACIÓN DE INCOMPATIBILIDADES SUTILES

La prueba de integridad puede realizarse para cumplir con otra función importante que se tiene en cuenta ocasionalmente: puede revelar incompatibilidades aun muy sutiles entre el filtro y el fluido que debe filtrarse, que pueden alterar el tamaño de los poros. Un ataque químico del fluido sobre el filtro, como el que puede ocasionar la hidrólisis inducida por pH o por oxidación, generalmente no es difícil de diagnosticar, porque resultan evidentes los cambios de color o la disolución del sólido. Sin embargo, las transformaciones sutiles no necesariamente son aparentes. El medio líquido puede plastificar el polímero sólido insinuando sus moléculas sobre las del sólido, disminuyendo la viscosidad del estado sólido. Como ocurre con el calor, éste puede permitir el movimiento molecular y, consecuentemente, puede ocurrir la liberación del estrés junto con la posible reducción y/o agrandamiento del poro.

Otros factores también pueden ocasionar cambios en la porosidad. La incorporación de moléculas de líquido entre el sólido, generalmente dilata el filtro. La dilatación agranda el espacio entre los poros. Como consecuencia la abertura queda reducida junto con la velocidad del flujo.

Los efectos de los líquidos sobre los sólidos integran una jerarquía de complicaciones que van aumentando desde la humectación de la superficie, pasando por la plastificación, hasta la solución total, con gradaciones entre medio. Los tiempos de exposición establecen la diferencia entre humectación de la superficie y el fenómeno de plastificación. La humectación de la superficie ocurre casi inmediatamente. La plastificación, la intrusión de moléculas líquidas entre el sólido, lleva su tiempo. Los dos efectos pueden juzgarse por separado exponiendo el filtro al producto líquido por períodos de diversa duración. La lectura de la integridad más inmediata reflejará la humectación del sólido con el líquido. La exposición más prolongada producirá la plastificación. Su duración deberá al menos ser igual al tiempo de contacto entre el filtro y el líquido durante el proceso de filtración completo.

Las diferencias entre los valores correspondientes a la integridad de la humectación con agua y la humectación con el producto, no deben involucrar las incompatibilidades. Deben reflejar meramente las diferencias en las tensiones de la superficie de los dos líquidos, un factor en la ecuación de ascenso capilar.

$$D = 4 l \cos(q) + P$$

donde D es el diámetro del poro, l es la tensión en la superficie del líquido, el  $\cos(q)$  es el ángulo de humectación y P es la presión.(3). En efecto, este es un caso de prueba de integridad.

Para saber si la exposición del filtro al líquido ocasiona cambios en la estructura del poro, deben obtenerse los valores correspondientes a la prueba de integridad luego de la exposición prolongada del filtro al producto líquido.

Sabemos que el grado de interacción entre el sólido y el líquido depende del grado de similitud entre sus uniones químicas individuales, cuantificadas por las densidades de la energía cohesiva (CEDs) que describen sus estructuras químicas, o por las raíces cuadradas y sus parámetros de solubilidad (SPs) (4- 7). Los SPs de las soluciones y los filtros dependen de sus estructuras moleculares, sin embargo, la determinación de estas propiedades no es un procedimiento muy común, y realmente puede resultar imposible predecir las incompatibilidades a partir de los datos de las CED, particularmente cuando no es posible conocer todos los componentes de una solución o un filtro. En términos prácticos, las alteraciones en la morfología de un filtro ocasionadas por la dilatación, aunque leve, o por los cambios en la distribución del tamaño de los poros o de la porosidad total, se detectan mejor realizando mediciones de flujo de aire difuso.

Estas mediciones reflejan los cambios aun en el caso de los poros más pequeños, mientras que las mediciones de los puntos de burbuja, sólo los reflejarán en el caso de los poros de mayor tamaño. Estos resultados pueden variar de acuerdo con el tipo de filtro, como consecuencia de las distintas uniones entre polímeros. Esta prueba de compatibilidad debe considerarse parte integrante de la rutina de validación del filtro. La posibilidad de que existan incompatibilidades debido a una similitud de unión entre el sólido (filtro) y el líquido puede ser pequeña cuando se encuentran ausentes las entidades químicas orgánicas en la preparación acuosa. Cuando están presentes, el riesgo es mayor en proporción con las cantidades y la naturaleza de su unión química expresada por los productos que determinan la solubilidad. Para analizar las posibilidades de que ocurran dichas

incompatibilidades, los ensayos de prefiltración deben realizarse antes de comenzar el proceso de filtración.. Debe ponerse en contacto el filtro y la preparación líquida durante el tiempo que llevará el proceso de producción real. Las mediciones realizadas arrojarán los resultados referidos a la integridad de la humectación del agua y la humectación del producto. Para determinar cuáles fueron las incompatibilidades será necesario remover el producto del filtro y redeterminar el valor de la humedad producida por el agua.. Luego se podrá realizar una comparación entre los valores de integridad antes y después de la exposición del producto a la humedad. El contacto total del filtro con el líquido, y eventualmente con el agua para el lavado, garantizará mejores resultados si el agua o el producto pasan a través del filtro durante el tiempo que se considere necesario. en lugar de sumergir el filtro pasivamente.

Desafortunadamente, no siempre es posible eliminar el producto por completo con un lavado con agua. El alcance de la incompatibilidad, si la hubiera, en estos casos quedaría reflejada en el cambio que se produzca en los valores de la prueba de integridad luego de la exposición y el lavado a nivel asintótico.

#### ● LA SITUACIÓN HA CAMBIADO

Hasta hace poco tiempo, la prueba de integridad establecía la validación de la filtración estéril. La demostración a través de la prueba de integridad, de que se utilizaba un filtro "esterilizador", era suficiente para la validación en sí misma. De esta forma se garantizaba que el efluente era estéril (9). La membrana "esterilizadora" constaba de un filtro de 0,2/0,22  $\mu\text{m}$ , correspondiente a cierta clase de filtro, cuyo fabricante aseguraba que había pasado la prueba de  $1 \times 10^7$  cfu de *Brevundimonas diminuta* por centímetro cuadrado del área de filtración.

Recientemente, se ha descubierto que existen otras influencias además del tamaño del poro que afectan la capacidad de esterilización del filtro, exigiendo la práctica de análisis microbiológicos basados en estudios sobre carga biológica, para confirmar la validación de los filtros. Erróneamente, algunos usuarios de filtros aún creen que los valores de integridad correctos, basados en las exclusiones en virtud del tamaño, garantizan un efluente estéril. Los filtros integrales, no necesariamente producen efluentes estériles. El medio líquido puede alterar el tamaño de los poros y/o el tamaño del organismo, y las influencias hidráulicas de las condiciones de la filtración, particularmente las presiones diferenciales, pueden formar un cuadro de retención.

Las capturas por absorción o impacto, las consideraciones relativamente independientes del tamaño del poro, también participan en las retenciones de organismos. La fuerza iónica y el pH de una preparación pueden modificar la doble capa eléctrica de las superficies del filtro y de la partícula afectando la absorción (10-14).

Estas diversas consideraciones hacen que las filtraciones estériles no queden garantizadas con la aprobación de la prueba de integridad. Existen otros aspectos relacionados con los filtros integrales.

#### ● FLUJO DE AIRE A TRAVÉS DEL FILTRO HUMEDECIDO

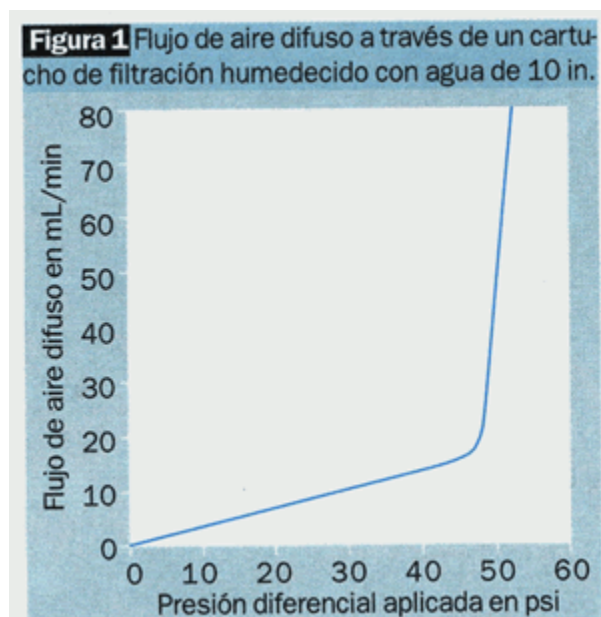
Las pruebas de integridad que se practican con los filtros de soluciones acuosas se basan en las mediciones de flujos de aire a través de ellos. Los filtros han sido humedecidos, sus poros están llenos de agua y las magnitudes de los flujos de aire son una consecuencia de las presiones de aire aplicadas ( También puede utilizarse el gas nitrógeno). Las condiciones involucradas han sido ampliamente descritas en la literatura recientemente por Schroeder (15).

Las técnicas más importantes para realizar las pruebas de integridad son las determinaciones del punto de burbuja, las mediciones del flujo de aire difuso y los estudios de mantenimiento y disminución de la presión, la última deriva de la prueba de difusión. Las estructuras de las membranas de microporos no se conocen demasiado bien, pero generalmente tienen forma de polígonos irregulares cuyas aperturas de interconexión constituyen las dimensiones restrictivas del poro responsable de las retenciones de las partículas, excluyéndolas en virtud de su tamaño (14-16). Se supone que los poros actúan como capilares - absorbiendo agua, a través de uniones de hidrógeno con sus superficies hidrófilas y vaciando su contenido acuoso bajo el ímpetu de la presión de aire, de acuerdo con la ecuación de Laplace (17). Esto significa que los poros de mayor diámetro se vacían primero al aplicar la presión del gas (18). Esto es de vital importancia en la retención de las partículas.

Cuando se aplica una presión de aire o de nitrógeno en un filtro humedecido, cuyos poros han sido llenados de agua, las moléculas de gas ubicadas en la parte superior de mayor presión se disuelven en la capa fija de agua

dentro de los poros, de acuerdo con la Ley de Henry, que establece que un gas se disuelve en un líquido en la proporción de su presión parcial ejercida sobre el líquido. El gas disuelto se desplaza en la misma dirección del flujo, que se encuentra en la presión menor. Allí, el gas sale de la solución bajo la presión menor; en un grado similar por la misma ley, escapando en forma de microburbujas o desplazamientos de agua, según el diseño experimental.

La velocidad de este flujo de aire difuso depende del diferencial de la presión a través de la membrana. A lo largo de una serie de momentos durante la prueba, en los que se tomaron las presiones que aumentan progresivamente, se puede trazar una línea recta con una pendiente moderada hasta que comienza a aumentar en forma curvilínea. Por encima de este punto, el flujo de aire curvo forma una línea pero con un ascenso más rápido. Esta línea ascendente del flujo de aire representa el flujo viscoso o pase libre del aire a través de los poros que han sido liberados de su carga acuosa, debido al fenómeno de capilaridad ascendente. Cuanto mayor sea el diámetro del poro, más fácilmente se liberará del líquido que contiene. Como se dijo anteriormente, la conjunción del flujo de aire difuso con el flujo de aire en masa, toma la forma de una curva hacia arriba (véase Figura 1).



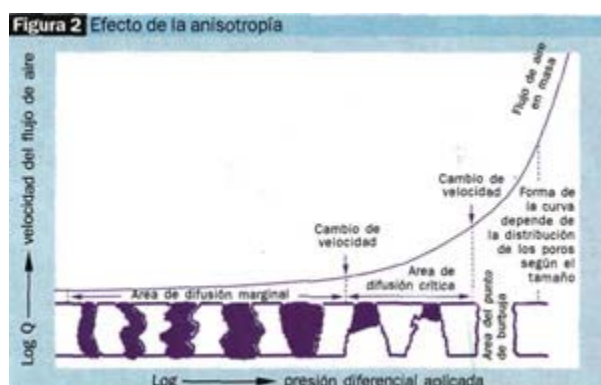
- **El área del ángulo de la curva**

En algún lugar de esta curva, el conjunto de poros más grandes pierde su carga acuosa, permitiendo el paso del aire en masa. Este es el punto de burbuja, que es particular para cada combinación de filtro y fluido. En virtud del tamaño del poro más grande del filtro, el punto de burbuja intrínseco tiene implicaciones directas en el paso de las partículas a través del filtro que no son retenidas por su tamaño. Sin embargo, puede ser diferente del punto de burbuja percibido, el momento en el que el flujo de aire en masa se torna aparente.

Se desconoce la cantidad de poros de mayor tamaño. Los poros pueden ser suficientemente grandes para permitir el paso de organismos, pero pueden ser pocos para permitir el paso de pequeños flujos de aire que escapan a la observación inmediata. Por esta razón, el punto de burbuja percibido, casi seguro es más elevado que el intrínseco (véase Referencia 19 para los cálculos que relacionan la cantidad de poros de distintos tamaños presentes en las membranas de microporos).

Como veremos más adelante, la ubicación exacta del punto de burbuja en la curva, es otro tema de discusión. Algunos consideran que, el primer corte en la línea recta del flujo de aire difuso, es el punto de burbuja, el comienzo de aire en masa. Otros, consideran que el inicio de la curva ascendente es aún parte del flujo de aire difuso ocasionado por las estructuras anisotrópicas del poro, poros en forma de "embudo" que apuntando hacia la corriente van vaciando su contenido progresivamente a medida que aumenta la presión. Los filmes que contienen agua se van afinando progresivamente, presentan menos impedimentos para el paso de los flujos de aire difusos (véase Figura 2) y por ello, aumenta la velocidad del flujo de aire.

Más allá del punto de burbuja, el ascenso constante del flujo de aire es el resultado de poros cada vez más pequeños que se van abriendo sucesivamente por la acción constante de la presión del gas. Las membranas microporosas con poros de tamaño más pequeño muestran intersecciones más agudas entre las dos líneas que representan el flujo (20).



### • PRUEBAS DE INTEGRIDAD PARA FILTROS HIDRÓFILOS

Los ensayos de punto de burbuja y las pruebas de flujo de aire difuso constituyen dos formas diferentes para verificar la integridad. Puede aplicarse una o ambas en determinadas circunstancias, aunque una u otra son más adecuadas en determinados contextos. Se complementan entre sí. No debería existir competencia alguna entre las pruebas a pesar de que ciertos fabricantes de filtros manifiestan su preferencia por una u otra prueba. Las consideraciones referidas a la prueba de integridad, sus fundamentos y los procedimientos han sido bien descritos en la literatura y recientemente fueron revisados por Jornitz y Meltzer (21).

#### • El punto de burbuja

El punto de burbuja se basa en el fenómeno de capilaridad ascendente. Simplificando la situación, los poros del filtro pueden considerarse capilares circulares. El agua sube a través de ellos, debido a la propensión a humedecer las paredes del poro. El ascenso del agua se produce a través del perímetro (circular) capilar,  $2\pi r$ ; se produce una humectación perfecta,  $\cos(\theta)$ ; e incluye  $\gamma$ , la tensión de la superficie del líquido. El ascenso se expresa de la siguiente manera  $2\pi r \gamma \cos(\theta)$ . Se balancea con la masa del líquido -incluyendo el área del capilar,  $\pi r^2$ , y  $h$ , su altura- igualando  $\pi r^2 h \rho g$ . Entonces,

$$2\pi r \gamma \cos(\theta) = \pi r^2 h \rho g$$

ó

$$h = \frac{2\gamma \cos(\theta)}{\rho g r}$$

Si sustituimos la presión por la altura del ascenso del agua definida por la gravedad y el diámetro del poro por radio, entonces  $P = \frac{4\gamma \cos(\theta)}{D}$ .

Existe una relación inversa entre el diámetro del poro y la presión necesaria para desbalancear (expeler) el ascenso capilar. En consecuencia, el punto de burbuja refleja los poros más grandes presentes en la membrana.

El punto de burbuja es una función del trabajo. Representa la fuerza necesaria para romper las uniones de las atracciones intermoleculares que caracterizan la humectación líquido-sólido.

Sin embargo, es diferente para cada par líquido-sólido (22). Por esta razón, el punto de burbuja, no es una medida absoluta de los tamaños específicos del poro.

La recomendación de la *Aerospace Recommended Practice* es "Ninguna prueba del punto de burbuja mide el tamaño real del poro, sólo permite establecer una correlación entre la presión capilar medida y algunas características dimensionales de las estructuras del poro" (23).

En el mejor de los casos, los valores numéricos asignados al tamaño del poro que realizan los fabricantes de membranas de sus productos, deben considerarse apreciaciones del fabricante en forma individual, sin la garantía de un estándar procedimental a nivel industrial.

### • Flujos de aire difuso

La prueba de flujo de aire difuso es una extensión de la ley de difusión de Fick (24-26), la cual representa una función de la porosidad total de un filtro (véase Figura 3). La ley de Fick establece que

$$N = DH (p_1 - p_2) r \div L$$

donde  $N$  es la velocidad de penetración (moles de gas por unidad de tiempo),  $D$  es la difusión del gas en el líquido,  $H$  es el coeficiente de solubilidad del gas en el líquido,  $L$  es el espesor del líquido en la membrana (igual al espesor de la membrana si los poros están llenos de líquido),  $(p_1 - p_2)$  es la presión transmembrana, y  $r$  es la porosidad total de la membrana.

En el procedimiento manual de punto de burbuja, el nivel de presión a la cual se detecta el desplazamiento constante de burbujas que ascienden a través de una capa superior de agua, señala la apertura del pasaje de un poro hacia el flujo de aire en masa. Alternativamente, puede medirse el volumen de agua desplazado por el escape del aire.

Los puntos de burbujas pueden relacionarse en forma directa con las retenciones de organismos. En realidad esa es una de las funciones principales. (Tal como señala Sundaram, "Para establecer la retención microbial de un filtro en condiciones específicas de un proceso o un producto, que son diferentes a las utilizadas por el fabricante del filtro, es necesario realizar una validación adicional en las condiciones específicas del usuario" [27].

La retención de organismos es una función que abarca más de la relación entre tamaño de partícula y tamaño del poro. Debe considerarse el posible efecto del líquido sobre las propiedades de la superficie y los tamaños del poro y del organismo y la influencia de las condiciones de filtración sobre las adsorciones). Cuando el área del filtro es tan pequeña que los flujos de aire difuso son demasiado pequeños como para realizar una medición confiable, deberá confiarse en la prueba del punto de burbuja.

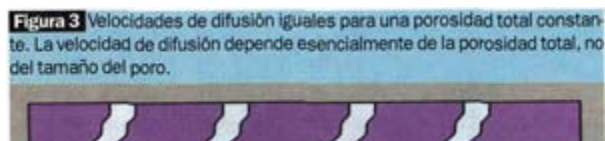
Las mediciones del flujo de aire difuso son indispensables cuando la exactitud de los puntos de burbuja está distorsionada por grandes flujos de aire difuso que pasan a través de áreas del filtro más extensas. En esos casos, la determinación del punto de burbuja puede ser extremadamente subjetiva.

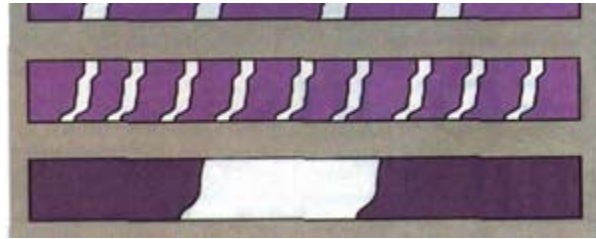
Las mediciones de aire difuso ofrecen ventajas cuando el fenómeno que se investiga está relacionado con cambios en la porosidad total, no exclusivamente con los poros más grandes. Para tomar las mediciones de flujo de aire difuso, el analista busca el punto de partida en la pendiente constante de la línea de flujo de aire difuso. Los equipos que realizan la prueba en forma automática miden el gas difuso durante un período de cinco minutos. Si no se excede el flujo de aire máximo, la presión se eleva, y el proceso se repite. Esta secuencia continúa hasta que se excede el flujo de aire máximo, identificando la ruptura o el punto de burbuja.

La integridad está señalada cuando la partida del trazo lineal no ocurre prematuramente

Los flujos de aire difuso pueden identificarse con mediciones de un solo punto o puntos múltiples. La correlación se establece entre los flujos de aire máximos y las retenciones microbiales. El pasaje bacteriano se comienza a observar cuando la velocidad alcanza ciertos valores.

En cuanto a reflejar la porosidad total, tanto de pequeños como grandes poros, el ensayo de flujo difuso es sensible aún a los pequeños cambios en la arquitectura del poro. Por esta razón, es una prueba de compatibilidad muy útil. La prueba de flujo de aire difuso de puntos múltiples puede ser útil para definir el punto de burbuja, el nivel de presión identificados los poros de mayor tamaño en un filtro.





### • Prueba de presión constante-disminución

Este ensayo es una variante de la medición de flujo de aire difuso. En la última prueba, se mantiene un determinado diferencial de presión sobre un filtro húmedo mientras se mide la cantidad de aire difuso. Durante el procedimiento de presión constante-disminución, se impone un nivel de presión particular sobre el lado superior del filtro húmedo.

Luego se elimina la presión, y el aire perdido del lado a favor de la corriente del housing que contiene el filtro, se va midiendo a medida que disminuye la presión durante un determinado período de tiempo.

Como ocurre en el caso de la prueba de flujo de aire difuso, en cada nivel de presión sucesivo, la unidad automática calcula la pérdida de presión máxima permitida suficiente para mantener la línea del flujo de aire difuso en su pendiente constante. Si no se excede el valor máximo de descenso, el ciclo se repite aplicando el nivel de presión inmediatamente superior, y así se continúa hasta alcanzar el valor máximo.

Generalmente, esta prueba se realiza con un equipo automático que, utilizando los algoritmos apropiados (software) convierte los datos de la presión constante-disminución en datos de flujo difuso, para los cuales existen correlaciones con las retenciones de organismos.

Una de las ventajas de la prueba de presión constante-disminuciones que determina la integridad del proceso completo de filtración, incluyendo el filtro. Esta prueba investiga la posibilidad de pérdidas o sellos inadecuados del sistema de filtración antes de realizar el proceso de filtración. Si se utiliza un equipo automático conectado con el filtro, se evitan los riesgos que apareja la asepsia de la membrana y minimiza la subjetividad de las personas y los errores operativos (28-30).

### • LOS POROS DE MAYOR TAMAÑO Y LA RETENCIÓN

Hemos dicho que el punto de burbuja tiene implicaciones directas en las retenciones de partículas, en cuanto al tamizado o la exclusión por tamaño. A partir del experimento de capilaridad ascendente, podemos concluir que el punto de burbuja evidencia la presencia de los poros de mayor tamaño en un filtro. Sin embargo, no disponemos de determinaciones numéricas y los valores obtenidos son relativos.

Las correlaciones entre los valores del punto de burbuja y las retenciones de organismos se han establecido con anterioridad (20, 31-33). Por ello, se han realizado grandes esfuerzos para identificar el punto de burbuja con gran exactitud. Con el propósito de lograr esta meta, se evita la subjetividad de la prueba del punto de burbuja manual, utilizando equipos de prueba anatómicos. Aún así estas determinaciones no son exactas, debido a las complicaciones ocasionadas por el flujo de aire a través de los poros anisotrópicos y por las limitaciones en la sensibilidad de las mediciones del flujo de aire, especialmente de los flujos en masa demasiado pequeños para ser medidos con exactitud.

### • IMPRECISION DEL PUNTO DE BURBUJA

Se supone que el punto de burbuja corresponde a los poros de "mayor tamaño" presentes en el filtro, por ello debería permitir la predicción de las retenciones de organismos en base al mecanismo de exclusión por tamaño. Sin embargo, luego de realizar la prueba, los puntos de burbuja hallados no son absolutos. Sus valores dependen del método empleado para medirlos, y el punto de burbuja determinado en una curva da lugar a una determinación ambigua.

### • Anisotropía

La zona del flujo que separa las líneas rectas de los flujos de aire difuso y en masa, es curva, y se forma al aplicar presiones más allá del punto de burbuja por la abertura progresiva de poros más pequeños permitiendo el pasaje de aire viscoso. Cuando se aplican presiones apenas por debajo del punto de burbuja, los poros anisotrópicos producen un efecto que mejora la difusión. Reti demostró experimentalmente que los poros "en forma de embudo", con aberturas más grandes en dirección a la corriente, se vacían de agua con presiones menores, tienen capas de agua más delgadas que los poros más simétricos (24).

El resultado es un impedimento menor para los flujos de aire difuso y el mejoramiento de las velocidades de difusión del aire. Esto, a su vez, torna incierto el punto en el cual los poros más grandes quedan libres de agua-el punto de burbuja intrínseco. Se desconoce la forma en que pueden determinarse las características de los poros anisotrópicos. Consecuentemente, la ubicación exacta del punto de burbuja sobre la curva siempre será incierta, porque todas las membranas tienen cierto grado de anisotropía.

Es interesante destacar que algunos investigadores desconocen el efecto anisotrópico, aunque reconocen que la ausencia de poros exactamente cilíndricos, junto con los flujos de gas de Knudsen, y la compresibilidad del gas, causan desviaciones del flujo de aire en masa ideal (27).

Estos investigadores definen el punto de burbuja intrínseco como la transición en la cual la porción recta de la línea de flujo de aire difuso, cambia la pendiente. Consideran que la región de la curva es el comienzo del flujo de aire en masa. El afinamiento de las capas de agua anisotrópico, que mejora la difusión, no es considerado parte terminal del flujo de aire difuso que precede al flujo de aire en masa.

No debe sorprendernos, que los puntos de burbuja percibidos en formas diversas siempre hayan sido más elevados que los puntos de burbuja intrínsecos, es decir que los indicados por los "datos de espectro del flujo" (27). Es claro que existe un desacuerdo acerca de cuales son los valores que representan el punto de burbuja intrínseco. Schroeder afirma que "El punto de partida de la transición entre la porción de difusión lineal del perfil, y la porción de flujo más empinada, predominantemente viscosa, es clave para cualquier interpretación de los datos, incluyendo el agregado de un valor numérico para la determinación del punto de burbuja"(15)

#### • Incidencia del área del filtro sobre el punto de burbuja

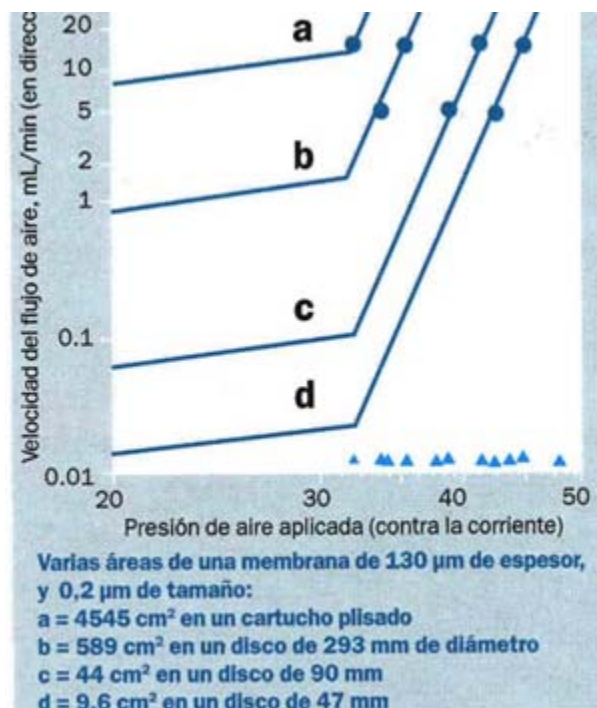
El área de un filtro homogéneo no afecta el punto de burbuja intrínseco ni, por supuesto, el tamaño de sus poros más grandes. Sin embargo, sí afecta la cantidad de aire que pasa a través del filtro por unidad de tiempo al aplicar cualquier presión, simplemente como una expresión del mayor número de poros grandes presentes en un área más extensa. El área del filtro afecta el punto de burbuja percibido, la instancia cuando ha pasado suficiente cantidad de aire en masa a través del filtro para transformarse en burbujas visibles(34). Un filtro de mayor tamaño simplemente permite el paso de más aire por unidad de tiempo porque tiene mayor cantidad de poros de cada tamaño de poro. Obviamente, la velocidad de filtración es directamente proporcional al área del filtro. Schroeder y DeLuca descubrieron que cuando el área del filtro aumenta diez veces, también aumenta diez el flujo de aire (35).

La figura 4 muestra que con un flujo de aire de 16 mL/min (observaciones del promedio del log. de 5 y 50 mL/min) la misma membrana en un tamaño de disco de 47 mm tiene un punto de burbuja de 44 psi, pero en forma de cartucho plegable (área de 4545 cm<sup>2</sup>) el punto de burbuja es 33 psi (34). El punto de burbuja intrínseco, la curva o punto de inflexión de cada una de las curvas en la figura 4, es invariable independientemente del tamaño. Es este punto de burbuja real y constante el que se correlaciona con las características de retención de organismos de cada filtro. El que difiere es el punto de burbuja percibido.

El efecto del área sobre los valores del punto de burbuja puede neutralizarse normalizando los datos del flujo de aire, tal como lo sugirieron Johnston y otros. Esto puede lograrse describiendo las velocidades del flujo de aire en función de la presión y del área del filtro.







*Desplazamiento aparente del punto de burbuja en función de la dimensión del filtro(34).*

Las unidades correspondientes a la velocidad del flujo de aire serían  $\text{mL}/\text{min cm}^2$ .

La figura 5 ilustra la ausencia de los efectos del área, que deriva de los datos del flujo de aire normalizado de acuerdo con la presión.

#### • Influencia del área del filtro en el flujo de aire difuso

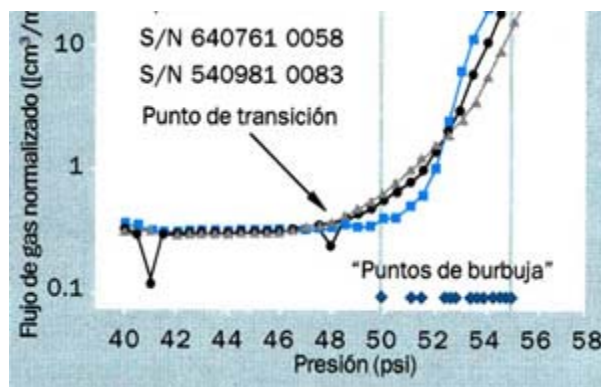
Las pruebas referidas al flujo de aire difuso serán consideradas en la Parte 2 de este artículo. Sin embargo, es importante para la presente discusión investigar la influencia del área del filtro sobre el flujo de aire difuso.

El flujo de aire difuso a través del filtro se produce mientras se eleva la presión durante la prueba, hasta alcanzar el punto de burbuja. Por supuesto, ese flujo es proporcional al área de filtración efectiva(EFA). Es difícil determinar el tamaño de un área que podría producir un flujo difuso para ofuscar el flujo de aire en masa en el punto de burbuja, y la estimación puede variar entre 500 y 1000  $\text{cm}^2$ . Sin embargo, el valor depende de la velocidad a la cual se eleve la presión hasta alcanzar el punto de burbuja. Cuanto más breve sea el intervalo, menor interferencia habrá. Por esta razón, es posible realizar una prueba de integridad con uniones de cartuchos múltiples utilizando la técnica del punto de burbuja sin que el flujo de aire difuso interfiera con la lectura del punto de burbuja.

Supongamos que tenemos un cartucho de 10 in con un flujo de aire difuso de 15  $\text{mL}/\text{min}$ . En su punto de burbuja, tendrá un cierto flujo de aire libre que excede los 15  $\text{mL}/\text{min}$ , tal vez alrededor de 540  $\text{mL}/\text{min}$ . Los tres cartuchos unidos suman 30 in. El flujo difuso sería de 45  $\text{mL}/\text{min}$ , pero el flujo de aire en masa en el punto de burbuja sería alrededor de 540  $\text{mL}/\text{min}$ , donde sólo participó una sección de las tres, proporcionalmente mayor si hubieran participado los tres. La unión de tres cartuchos de 30 in tendría un flujo difuso de 136  $\text{mL}/\text{min}$ , pero el punto de burbuja de una de las secciones sería alrededor de los 540  $\text{mL}/\text{min}$ .

La diferencia entre 136 y 540 es suficientemente grande como para diferenciar los dos flujos de aire, siempre que se minimice el tiempo para alcanzar el punto de burbuja.





*Espectro del flujo hacia delante de cartuchos Sartopore PES de 0,2 µm, graficado en forma de flujo de gas normalizado ( $[cm^3/min]/psi$ ) en función de la presión de gas aplicada.*

*Las líneas punteadas representan la región en la cual se asignaron los puntos de burbuja humedecidos con agua para estos filtros en las distintas pruebas relacionadas con el punto de burbuja.*

*También se grafican los puntos de burbuja reales. En este caso, la transición de flujo difuso a flujo en masa se produce claramente ~48 psi (3310 mbar) mientras que la mayoría de los valores correspondientes a los puntos de burbuja medidos para estos filtros en distintas pruebas relacionadas con el punto de burbuja, son significativamente más elevados, la mayoría entre 53 y 55 psi (3657- 3795 mbar) (27).*

Sin embargo, si se tardaran cuatro o cinco minutos en alcanzar el punto de burbuja, el flujo de aire difuso total sería igual al flujo de aire viscoso, en masa, libre de 540 mL/min. No se podría establecer una diferencia entre los flujos de aire, se confundiría el flujo de aire difuso con el punto de burbuja. Si se utilizaran 12 cartuchos de 30 en el punto de burbuja quedaría opacado por el flujo de aire difuso, independientemente de la velocidad en la que se alcance el punto de burbuja.

- **La falta de homogeneidad en las áreas del filtro**

Los métodos empleados en la fabricación de filtros forman parte del secreto del propietario. No obstante, los detalles sobre el modo principal de la elaboración son bien conocidos como para especular aplicando la inteligencia. La colocación de una solución sobre una cinta que corre sin fin, forma una capa líquida viscosa con un espesor muy preciso. La solidificación de esta capa para formar una membrana microporosa comprende la evaporación controlada y el secado, entre otros procesos. No obstante, las diversas áreas no se secan a la misma velocidad. La evaporación y el secado se producen más rápidamente en los bordes y más lentamente en el área central, alejada de los bordes. La formación de los poros es una consecuencia del proceso de evaporación y secado; las diferencias en la velocidad del secado producen diferentes características de la porosidad. Es por ello que inevitablemente existen diferencias en la homogeneidad inherentes a la expansión de la capa. No es suficiente para comprometer las diversas aplicaciones farmacéuticas en las que se utilizan los filtros, pero constituye una prueba de integridad en sí misma y para ciertos usos. (En una membrana microporosa utilizada en estudios de electroforesis, una aplicación particularmente sensible a la irregularidad de los poros, deberá cortarse y utilizar sólo los 30 cm centrales de los 90 cm totales para evitar el uso de los bordes con diferencias extremas en sus poros).

Sundaram y otros han llevado a cabo una prueba de integridad extremadamente detallada de una membrana con un EFA de 1,0 ft<sup>2</sup> (930 cm<sup>2</sup>), obtenida de un cartucho de 5 ft<sup>2</sup> (4650 cm<sup>2</sup>) de filtro (36). Se cortaron discos de 142 mm con una EFA de 0,15 ft<sup>2</sup> (140 cm<sup>2</sup>) y de éstos se cortaron discos de 47 mm con una EFA de 0,015 ft<sup>2</sup> (13,9 cm<sup>2</sup>). Las mediciones manuales del punto de burbuja mostraron que "a medida que disminuye el área del filtro en forma consecutiva, aumentan los valores correspondientes a las mediciones del *punto de burbuja*". El hecho de que la falta de homogeneidad del filtro está involucrada queda claro, en virtud de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con equipos automáticos. Estos demuestran que "sólo se produjeron cambios apreciables en los valores correspondientes al punto de burbuja cuando se utilizó un cartucho de 47 mm".

Existieron pocas o ninguna diferencia entre las lecturas de los discos de 142 mm, los discos de 1,0mm y los cartuchos. "Sin embargo, los puntos de burbuja medidos en los discos de 47 mm excedieron alrededor de 4 psi(275 mbar), los valores correspondientes a los cartuchos". Estos datos indican que no sólo la falta de homogeneidad de la membrana está involucrada, sino que el área unitaria caracterizada se encuentra entre 47 y 142 mmde diámetro para los filtros examinados. Los filtros que exceden esta área unitaria tendrán puntos de burbuja inferiores, como consecuencia de la falta de homogeneidad. La posibilidad de que los filtros con áreas más pequeñas produzcan estos efectos, dependerá inversamente de la cantidad de aquellos que puedan contarse de la membrana más grande.

Por ésta razón, cada vez con más frecuencia los fabricantes de filtros estudian la tendencia a la retención de organismos de sus filtros, utilizando áreas de membrana más grandes que los discos de 47 mm, que aún constituyen el estándar. Sería mejor si se utilizara el filtro de mayor tamaño en la producción. Sin embargo, se necesitaría una cantidad de 30 L o similar de producto para validar un cartucho de 10 in, y el costo resultaría prohibitivo en el caso de que un producto muy costoso estuviera involucrado. Al menos un fabricante utiliza filtros de 150 cm<sup>2</sup> de EFA cuando realiza los estudios de validación de los filtros para comprobar la retención de organismos.

#### • Sensibilidad de la medición.

La identificación exacta del punto de burbuja, la identificación de los poros de mayor tamaño, también está limitada por la velocidad del flujo de aire relacionada con la sensibilidad de la medición de este flujo de aire. Es posible que existan oros suficientemente grandes para permitir la penetración de microorganismos, pero muy pocos permiten que el aire los atraviese de modo tal que se lo pueda medir. También deben tenerse en cuenta las limitaciones de los aparatos de medición, el hardware.

En esos casos los valores correspondientes al punto de burbuja y a los niveles de retención de organismos no arrojarían resultados congruentes. Esto también vale para aquellas instancias muy poco frecuentes en las que, se cumplen los criterios del punto de burbuja o del flujo de aire difuso, y una de las dos pruebas falla.

#### • Perspectivas.

Por todas estas razones, la lectura del punto de burbuja presenta cierta incertidumbre. En la parte II de éste artículo, veremos cómo se puede conocer con mayor exactitud el punto de burbuja implementándolo con los datos del flujo de aire difuso. A pesar de la inexactitud de cada una de las lecturas, las mediciones del flujo de aire difuso en conjunto con las determinaciones el punto de burbuja, permiten la ubicación precisa del origen del flujo de aire en masa. Estos es uy significativo, ya que dos usos muy importantes de la prueba de integridad derivan de las relaciones entre los valores de la prueba de integridad y las retenciones de los organismos. El primero es la identificación del filtro "esterilizador" caracterizado por su capacidad de retención de  $1 \times 10^7$  de *B. Diminuta* por centímetro cuadrado del área del filtro. El segundo, es la determinación de la proporción entre los valores de la prueba de integridad correspondiente a la humedad del agua y a la humedad del producto, necesarios para realizar el ejercicio de validación del filtro.

Este artículo completo consta de dos publicaciones por separado. A paste II será publicada en el próximo número, allí se debatirá acerca de las mediciones del flujo de aire difuso, particularmente su rol en la determinación del punto de burbuja exacto. Se demostrará la utilidad de las pruebas de integridad para determinar si un filtro es "esterilizador y se definirá la proporción entre los valores de la prueba correspondientes a la humedad del agua y a la humedad del producto, necesarios para realizar las validaciones de los filtros.

#### REFERENCIAS.

- 1.FDA, *Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing* (Division of Manufacturing and Product Quality, Office of Compliance, Center for Drugs and Biologics, Rockville, MD, 1987).
- 2.ISO 13408-1, "Aseptic Processing of Health Care Products. Part I: General Requirements" (1 August 1998).
- 3.T.H. Meltzer, *Filtration in the Pharmaceutical Industry* (Marcel Dekker, New York, NT 1987), pp. 89-96.
- 4.J.H. Hildebrand and R.L. Scott, *Solubility of Non-Electrolytes*, (Rheinhold, New York, NY 1950).

- 19.D.B. Pall, "Quality Control of Absolute Removal Bacteria Filters" *Bull- Parenteral Drug Assoc.* 20 (4), 192-204 (1975).
- 20.D.B. Pall ada E.A. Kimbauer, "Bacterial Removal Prediction in Membrane Filters" presented at the 52d Colloid ana Surface Symposium, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, 12 June 1978.
- 21.M.W. Jormitz and T.H. Meltzer, *Sterile Filtration - A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, NY 2001), Chapter 7.

- 5.C.M. Hansen and A. Beerbower, "Solubility Parameters" in *Enc. Chem. Tech. Suppl.* (Wiley Interscience, New York, NY 1971).
- 6.R.C. Lukaszewicz and T.H. Meltzer, "On the Structural Compatibilities of Membrane Filters" *J. Parenteral Drug Assoc.* 34 (6), 463-472 (1980).
- 7.T.H. Meltzer, *Filtration in the Pharmaceutical Industry* (Marcel Dekker, New York, NY, 1987) pp. 159-174.
- 8.O.W. Reif, "Extractables and Compatibilites in Filters" in *Filtration in the Biopharmaceutical Industry* T.H. Meltzer and M.W. Jomitz, Eds. (Marcel Dekker, New York, NY, 1998), pp.199-244.
9. J.J. Errico, "Validation of Aseptic Processing Filters" in *Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes*, F.J. Carleton and J.P. Agalloco, Eds. (Marcel Dekker, New York, 1996), p. 428.
- 10.R.V. Levy et al., "The Matrix Approach: Microbial Retention Testing of Sterilizing-Grade Filters With Final Parenteral Products, Part II" *Pharm. Technol.* 15 (5), 58-68 (1991).
- 11.T.H. Meltzer, M.W. Jomitz, and M.W. Mittelman, "Surrogate Attributes and Use Conditions: Effects on Bacterial Cell Size and Surface Charge Relevant to Filter Validation Studies" presented at PDA Second Asian Symposium, Osaka, Japan, 17-19 February 1997.
- 12.M.W. Mittelman, M.W. Jomitz, and T.H. Meltzer, "Bacterial Cell Size and Surface Charge Characteristics Relevant to Filter Validation Studies" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52 (1), 37-42 (1998).
- 13.K. Kawamura, M.W. Jomitz, and T.H. Meltzer, "Absolute or Sterilizing Grade Filtration - What is Required?" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 54 (6), 485-492 (2000).
- 14.M.W. Jomitz and T.H. Meltzer, *Sterile Filtration - A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, NY, 2001).
- 15.H.G. Schroeder, "Rationalization and Valid Scale-Up of Integrity Test Parameters for Sterilizing Grade Filter Cartridges" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 55 (2), 134-142 (2001).
- 16.R.E. Williams and T.H. Meltzer, "Membrane Structure, the Bubble Point and Particle Retention" *Pharm. Technol.* 7 (5), 36-42 (1983).
- 17.P.R. Johnston, *Fluid Sterilization by Filtration* (Interpharm Press, 1st ed., Buffalo Grove, IL, 1992), pp. 90-110.
- 18.M.W. Jomitz and T.H. Meltzer, *Sterile Filtration - A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, NY 2001), pp. 336-373.
- 22.A. Baszkin, D.J. Lyman, and T.H. Meltzer, "Theoretical Considerations of Bubble Point Measurement: Solid/Liquid Wetting Interaction" *Pharm. Technol.* 2 (1), 21-31 (1978).
- 23.Society of Automotive Engineers, *Bubble Point Test Method*, Aerospace Recommended Practice ARP-901 (1968).
- 24.A.R. Reti, "An Assessment of Test Criteria in Evaluating the Performance and Integrity of Sterilizing Filters" *Bull. Parenteral Drug Assoc.* 31 (4), 187-194 (1977).
- 25.P.J. Waibel, M.W. Jomitz, and T.H. Meltzer, "Diffusive Airflow Integrity Testing" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 50 (5), 311-316 (1996).
- 26.M.W. Jomitz, D.J. Brose, and T.H. Meltzer, "Experimental Evaluations of Diffusive Airflow Integrity Testing" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52 (1), 46-49 (1998).
- 27.S. Sundaram et al., "Bubble Point Type Tests as Filter Integrity Tests, Part I" *Pharm. Technol.* 24 (9), 90-115 (2000).
- 28.Parenteral Drug Association, Technical Report No. 26, "Sterilizing Filtration of Liquids" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52 (3), 1-31 (1998).
- 29.A.M. Trotter and T.H. Meltzer, "The Pressure Hold/Drop Integrity Test: Its Correlation to Diffusive Flow" *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52 (4), 182-185 (1998).
- 30.M.W. Jomitz and T.H. Meltzer, *Sterile Filtration - A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, NY, 2001), pp. 426-434.
- 31.A.R. Reti, T.J. Leahy, and P.M. Meier, "The Retention Mechanism of Sterilizing and Other Submicron High Efficiency Structures" *Proceedings of the Second World Filtration Congress*, (London, UK, 1979), pp. 427-435.
- 32.P.R. Johnston and T.H. Meltzer, "Comments on Organism Challenge Levels in Sterilizing Filer Efficiency Testing" *Pharm. Technol.* 3 (11), 66-70, 110 (1979).
- 33.T.J. Leahy and M.J. Sullivan, "Validation of Bacterial Retention Capabilities of Membrane Filters" *Pharm. Technol.* 2, 65-75 (1978).
- 34.P.R. Johnston, R.C. Lukaszewicz, and T.H. Meltzer, "Certain Imprecisions in the Bubble Point Measurement" *J. Parenteral Sci. Technol.* 35 (1), 36-39 (1981).
- 35.H.G. Schroeder and P.P. DeLuca, "Theoretical Aspects of Sterile Filtration and Integrity Testing" *Pharm. Technol.* 4 (11), 80-85 (1980).
- 36.S. Sundaram et al. "Considerations in Using Bubble Point" Type Tests as Filter Integrity Tests, Part II" *Pharm. Technol.* 24 (10), 108-137 (2000).