ISBN 978-987-46701-4-4

Sección III.
Instalaciones y su influencia en la calidad microbiológica de los productos.

página

Capítulo III.1. **Diseño del Laboratorio de Microbiología** **217**
Carlos Luis Llorens

Capítulo III.2. **Equipamiento. Calificación y control** **229**
Graciela Torno

Capítulo III.3. **Filtros HEPA, flujo laminar y cabinas de bioseguridad** **235**
Mino Covo

Capítulo III.4. **Aguas para Aplicaciones Farmacéuticas** **263**
Carlos Chiesa

Capítulo III.5. **Biopelículas** **278**
Silvia E. Rastelli

Capítulo III.1.

Diseño del Laboratorio de Microbiología

Arq. Carlos Luis Llorens

Preparar la necesidad

Comienzo del diseño

Guion de Microbiología

El anteproyecto

Medidas y formas

El proyecto

Tipos de mobiliarios

Materiales para muebles

Complemento

1. Preparar la necesidad

Antes de comenzar con un diseño, o distribución de espacios, con o sin asistencia de un arquitecto, es necesario crear el Requerimiento de Usuario (URS) al respecto. Ese URS entre los distintos capítulos, deberá incluir lo mínimo necesario que el diseñador necesita para preparar el Plan de Necesidades.

Lo básico que el diseñador necesita es:

- Descripción del destino de la actividad
- Si forma parte de un complejo industrial, universitario, de investigación, etc.
- Descripción de las distintas tareas que se desarrollarán en el laboratorio.
- Flujograma de esa actividad.
- Nómina de los locales.
- En cada local, equipamiento relevante que esté apoyado en el piso y que esté apoyado en forma permanente sobre mesadas.
- Cantidad de personal involucrado, con discriminación de actividad y sexo.

Con esta información, el diseñador podrá dimensionar los distintos locales, obtener la superficie de cada ambiente, calificar las distintas zonas en su condición higiénica y agregar lo necesario para que la actividad pueda desarrollarse con las condiciones ambientales adecuadas. También podrá evaluar las instalaciones complementarias para su funcionamiento, que podrán ser dependientes de otro conjunto de servicios de donde se podrá vincular.

El Plan de Necesidades (PN) es una planilla de datos ordenadora, que permitirá obtener las superficies totales del emprendimiento con sus distintas condiciones. Se podrá darle valor a cada condición y estimar antes del comienzo del diseño el costo del mismo. (Ver Tabla 1)

Tabla 1: *Plan de necesidades*

Sector		Nº	Local	Destino	Zona ISO	Medidas			Superficie	Equipos relevantes	Observaciones
						Largo	Ancho	Alto			
CALIDAD	AREA GENERAL	GE.01	Acceso	Entrada de personal	NC	4,00	2,60	2,60	10,40	Mostrador	
		GE.02	Vestuario Hombres	Cambio de ropa de calle	NC	3,00	4,00	2,60	12,00	18 lockers	
		GE.03	SS Hombres		NC	2,60	3,00	2,60	7,80	2 Inodoros 1 mingitorio 2 lavabos	
		GE.04	Vestuario Mujeres	Cambio de ropa de calle	NC	3,80	4,00	2,60	15,20	24 lockers	
		GE.05	SS Mujeres		NC	2,60	3,20	2,60	8,32	3 inodoros 3 lavabos	
		GE.06	Ropería	Guarda de mudas	NC	2,00	3,00	2,60	6,00	4 módulos estanterías 0,9 x 0,45 + 1 mesada de 1,40 m	
		GE.07	Gerencia	Gerente de CC	NC	3,60	3,40	2,60	12,24	1 puesto trabajo clase A	
		GE.08	Biblioteca	Sala de consulta y de reuniones	9	4,00	3,60	2,60	14,40	Biblioteca. Mesa para 6 personas	
		GE.09	Circulación CC	Vincula Labs.	NC	6,00	1,80	2,60	10,80		
									97,16		
	LABORATORIO FQ	FQ.01	Balanzas No Segregadas	Pesada de materias no segregadas	9	2,40	2,00	2,60	4,80	2 balanzas y 1 Karl Fischer	
		FQ.02	Balanzas Segregados.	Pesada de materias segregadas, como citos, hormonas compatibles, etc	8	3,20	2,40	2,60	7,68	1 campana de 1,50, Cabina de Bioseguridad B2, mesada, mesita rodante, 3 balanzas	
		FQ.03	Vestidor Pesadas Segregados	Vestidor	9/8	2,00	1,40	2,60	2,80	Banco transferencia	
		FQ.03	Cromatógrafo gaseoso		9	2,00	2,40	2,60	4,80	1 cromatógrafo, 1 PC, mesada de apoyo	Se ubicará tubos de Hidrógeno o generador de H.
		FQ.04	Instrumentos FQ	Sector o sala para ubicar los instrumentos o aparatos sensibles.	9	4,00	5,60	3,00	22,40	Mesadas, 5 HPLCs, 4 Pcs, 1 Polarímetro, 1 Espectrofotómeto UV, 1 IR	Iluminación regulable, poca luz natural, inyección aire limpio.
		FQ.05	Disolutores		9	2,90	3,00	3,00	8,70	2 disolutores, 1 pileta 1 mesada	Iluminación antiactínica
		FQ.06	Laboratorio General FQ		9	10,00	4,00	3,00	40,00	Sala general con mesadas, muebles, campanas, heladeras, freezer, tituladora y PC, caja de revelado, droguero, seguridad, etc	Iluminación antiactínica
		FQ.07	Depósito de Insumos FQ.	Guarda de insumos del área	9	2,50	2,00	2,60	5,00	Estanterías perimetrales	Iluminación antiactínica
		FQ.08	Lavadero FQ	Lavadero de vidrios y utensillos	9	2,90	4,00	2,60	11,60	Mesadas, piletas, lavadora y estufa de secado	
		FQ.09	Oficina Jefe FQ		9	3,80	3,20	2,60	12,16	1 puesto de trabajo	Vista al FQ.06
		FQ.10	Oficina Asistente CC		9	3,00	2,50	2,60	7,50	1 puesto de trabajo abierto	
		FQ.11	Oficina Supervisor CC		9	2,60	3,00	2,60	7,80	1 puesto de trabajo clase B	Muy vinculado al FQ.06
		FQ.12	Oficina Asistente CC Tec	Asistente técnico	9	2,60	3,00	2,60	7,80	1 puesto de trabajo, semi abierta clase C	
		FQ.13	Oficina Checker's	Ubicación de 4 checker´s	9	5,00	4,00	2,60	20,00	4 puestos de trabajo semi abierto clase C. Armario de 2 puertas para elementos	

En el PN, deberá indicar alguna característica particular (además de las ISO) que debe tener el ambiente, que condiciona el diseño, como porcentajes bajos de humedad, anti explosividad, anti vibraciones, acústica, etc.

Conociendo la cantidad de analistas, se puede obtener medidas de aproximación, que más adelante se deben corroborar con la actividad analizada en detalle.

A continuación se detallan las superficies y medidas que pueden usarse para una aproximación (Ejemplos para poblaciones totales mayores a 20 personas):

• Vestuario con sanitario	1,60 m^2 por persona
• Vestuario sin sanitario	1,00 m^2 por persona
• Mesada de trabajo por cada operador	3,00 m de largo de mesada (promedio)
• Superficie global del laboratorio sin Sala de Máquinas)	9,00 m^2 por analista (todo incluido)
• Salón Microbiología	8,00 m^2 por analista
• Preparación de Medios	8,00 m^2 por persona
• Lavadero	8,50 m^2 por persona
• Pesadas y entorno	1,40 m^2 por mesa
• Control de Esterilidad completo con esclusas	12,50 m^2 en adelante
• Control higiénico completo con esclusa	10,00 m^2 en adelante
• Sala de estabilidad	2,20 m^2 por cada equipo de 1 m2
• Equipo y entorno por cada CBS de 1,20 m	7,00 m^2 por equipo
• Equipo y entorno por cada CBS de 1,50 m	8,00 m^2 por equipo
• Equipo y entorno por cada campana de 1,20 m	2,50 m^2 por equipo
• Equipo y entorno por cada campana de 1,50 m	3,10 m^2 por equipo
• Equipo y entorno por cada campana de 1,80 m	3,70 m^2 por equipo
• HPLCs y entorno	1,50 m^2 por equipo
• Sala de reuniones / entrenamiento	1,60 m^2 por persona (a partir de 6)
• Oficina Gerente	12,00 m^2
• Oficina Jefe	9,00 m^2
• Oficina abierta	4,50 m^2 por persona
• Depósito de muestras y archivos	3,00 m^2 por cada 100 cajas de 0,45 x 0,30x 0,15 m
• Sala de Máquinas para HVAC, PW, Vacío, Aire comprimido, gases, electricidad, etc.	25 % de la superficie global
• Espesores de paredes, escaleras y conductos	8 % de la superficie global

Como ejemplo, un laboratorio de microbiología donde trabajen 20 personas podrá requerir de 240 m^2 aproximadamente, incluyendo todo. Si el laboratorio forma parte de un edificio con otras actividades, la superficie se reduce proporcionalmente a lo compartido.

2. Comienzo del diseño

La distribución general es relativa en función del lugar que se implante. Sin embargo hay distribuciones que siempre terminan en buenos resultados. El Laboratorio de Microbiología en general es parte del complejo Control de Calidad. Como está visto en el ejemplo presentado en el Plan de Necesidades, Microbiología ocupa un 25 %.
En los esquemas los “globos” tienen las superficies proporcionadas al porcentaje. (ver Figuras 1 y 2) Pueden lograrse distintas alternativas de relación de los distintos sectores.
Se observa que siempre es conveniente que la circulación principal divida de un lado los Laboratorios y del otro las Áreas Generales. El Área Técnica está en un ejemplo en línea punteada que significa que está por encima. En la otra ilustración está en el mismo nivel.

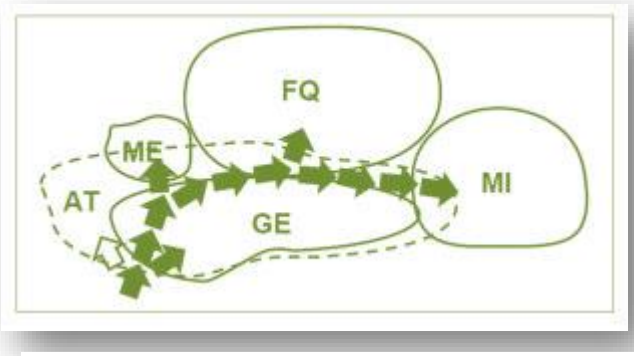


Figura 1 *– Distribución 1*

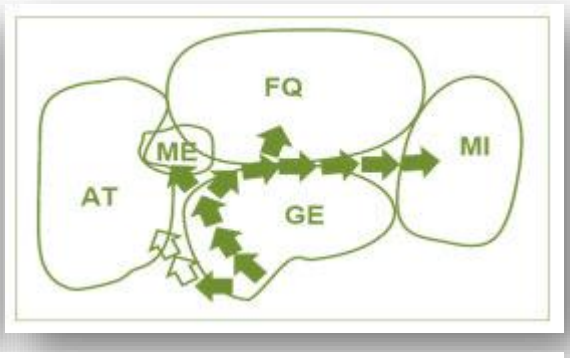


Figura 2 *– Distribución 2*

3. Guion de Microbiología

Es la primera imagen gráfica que puede demostrar una interrelación entre sectores. Con un concepto similar se distribuyen los locales del Laboratorio de Microbiología dentro del contexto de la distribución general seleccionada. (ver Figura 3) Podrán necesitarse diferenciación de locales del mismo destino en caso de preparar o analizar segregados.

En oportunidades, es conveniente que el ingreso de personal al Laboratorio de Microbiología sea a través de una esclusa con puertas enclavadas. Esta esclusa permitirá colocarse ropa exclusiva del sector y al dotarla de presión positiva controlar contaminaciones vía aire.

El control higiénico (o control de materiales no estériles) podrá realizarse en ambientes de condición ISO 9, bajo un flujo laminar, que no precisa de un vestidor previo. Sin embargo considero que debe realizarse en sala separada con presión negativa. Aun así, al nivelarse presiones al abrirse la puerta se podrían correr riesgos. Para limitarlos es conveniente una esclusa vestidor de acceso, que además daría la ventaja de introducir una mejora de calificación higiénica.

Se podrán encontrar múltiples variantes, con ventajas entre una y otras. Se deberá verificar las interrelaciones funcionales, marcando los flujos principales de personas en sus distintos estados de vestimenta por condición higiénica, de materiales y muestras y de residuos. (ver Figura 4).

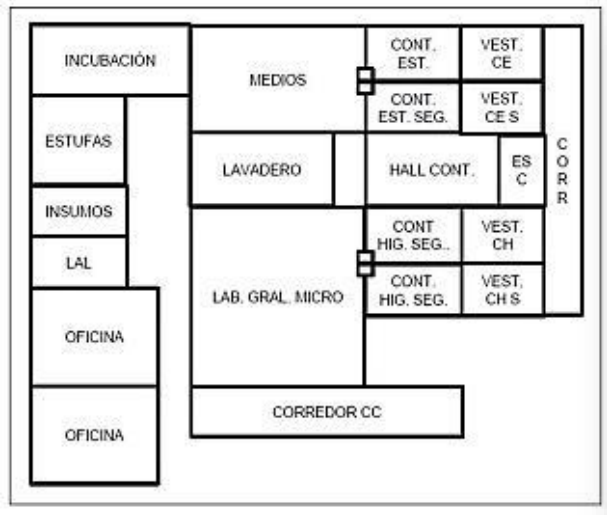


Figura 3 *– Laboratorio de Microbiología*

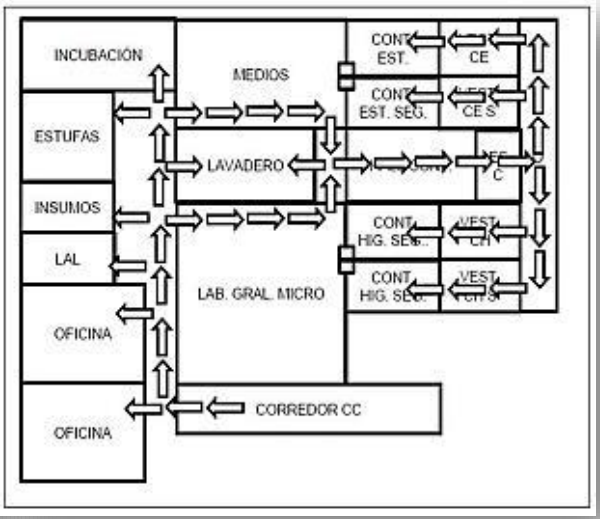


Figura 4 *– Flujos del Laboratorio*

Los locales que deben estar vinculados en forma directa son:

- Laboratorio General de Microbiología con Control Higiénico vía *pass throughs*
- Medios con Control de Esterilidad vía *pass throughs*
- Lavadero con Laboratorio General de Microbiología y Medios
- Laboratorio General de Microbiología con Medios
- Los vestidores encadenados para ingreso a Control Higiénico y a Control de Esterilidad

Se deberá considerar que los locales de Control Clase ISO 7 o 5, deben tener ventanas hacia algún sector para que el personal pueda ser vigilado y asistido en caso de necesidad.

Se deberán incluir los vestidores esclusas entre cada cambio de condición higiénica o en otras circunstancias como en los casos de protección del entorno.

Los vestidores deberán tener un banco de transferencia, para delimitar los sectores protegidos. Se deberá impedir el paso de rodantes entre una clase y otra.

La esclusa vestidor como el *pass through* es una frontera, como también lo es autoclaves, estufas y cámaras de descontaminación de dos puertas.

Las puertas de las fronteras deberán estar enclavadas, para no permitir aperturas simultáneas. En las autoclaves, estufas y cámaras, como también duchas descontaminantes el tiempo de permanencia es fundamental.

Como todo traspaso requiere cambios de ropa, preparación de los materiales o permanencia, se deben estimar los tiempos para un cálculo de efectividad de tareas. Por ello se debe seleccionar adecuadamente la vestimenta, calzado y coberturas, para que estén balanceados en tiempos, costos, comodidad y eficacia. No hay un patrón común, sino que cada laboratorio tiene características particulares que pueden condicionar la selección de ropas o marcar procedimientos, que podrán recabar de una solución arquitectónica distinta.

Durante el Guion, se deberá prever, las entradas de equipos voluminosos y en qué etapa de obra se producirá, como también su reemplazo o retiro para reparación.

La utilización de aisladores condiciona el diseño. Bien sabido es que la operación realizada aislada del medio que la rodea, cuanto más pequeño sea el lugar contenido, es más segura para el medio ambiente, el operario y el material trabajado. Se anulan esclusas vestidores, *pass throughs* y se reducen las filtraciones y volúmenes de aire acondicionado.

Los costos de los aisladores son en muchos casos más convenientes que superficies y volúmenes construidos, más ropas y tiempos empleados en preparación y validación de áreas.

Determinar el uso de aisladores se deberá tomar al inicio del proyecto, siendo mucho mejor que sea impuesto en el URS.

Durante el desarrollo del Guion se indicará al diseñador, alguna característica particular del equipamiento que requiera atención particular, como utilización de reactivos disolventes de PVC, o ácidos, que puedan afectar superficies, durante las operaciones. Requieren especial atención condiciones de corrientes de aire y vibraciones para balanzas, olor en alguna preparación, calor localizado, humos, gases, pisos conductivos o no, luz antiactínica, obtención de penumbra, luz natural, encandilamiento, destellos, ruidos o silbidos de centrifugas, etc.

Esas condiciones y otras propias de la seguridad, como vías de escape, duchas, lavaojos, alarmas, antirrobos y antivandalismo, serán discutidas en su alcance en esta etapa de diseño.

4. El Anteproyecto

El anteproyecto, es un borrador del proyecto final. Es un anticipo, la base que una vez aprobada sirve para desarrollar todos los documentos que integran el proyecto.

En esta etapa, se definen las puertas, ventanas, distribución de los muebles, materiales de construcción y terminación, y necesidades de los servicios. Para ello, se utiliza una Planilla de Ambientes y Terminaciones (PAT), que se confecciona extrayendo los datos del PN y del Guion precedente agregando ahora instalaciones y

terminaciones. (Ver Figuras 5, 6, 7 y 8) La planilla se confecciona en una sola lámina que involucra todas las instalaciones. En las figuras están separadas por comodidad de la presente publicación.

Como observamos en la Planilla de Ambientes de HVAC, se seleccionan locales con la presión definida, creando los flujos correspondientes. Entre cada salto higiénico se deben prever 12,5 pascales. Es normal tomar 15 pascales para no estar en el límite

PLANILLA DE TERMINACIONES

Sector		Nº	Local	CONTRAPISOS					MUROS						PISOS					ZÓCALOS			REVOQUES				REVEST			CIE
				ALISADO IMPERMEABLE	BARRERA DE VAPOR DOBLE FOIL DE	HORMIGÓN POBRE H4	HORMIGÓN H21	OTROS	LADRILLO COMÚN	BLOQUE HORM. 19 X 19 X 33 ARMADO	LADRILLO HUECO PORTANTE	CARTÓN YESO COMÚN	CARTÓN YESO ANTIHUMEDAD	PLACA CEMENTICIA	OTROS	MORTERO EPOXI 3mm	GRES CERAM. 20 x 20	GRES CERAM. ANTIDESLIZANTE 20 x 20	VINILICO SOLDADO	OTROS	IDEM AL PISO ALTURA 10 CM	SANITARIO radio 5 cm ó RECTO	OTROS	YESO REFORZADO	IMPERMEABLE GRUESO Y FINO	GRUESO BAJO REVESTIMIENTO	OTROS	VINÍLICO EN ROLLO SOLDADO	CERAMICO 20x20	OTROS	CARTÓN YESO COMÚN SIMPLE
CONTROL DE CALIDAD	LABORATORIO FQ	FQ.13	Oficina Checker's	X	X		X			X		X							X		X	R			X	X		X			
		FQ.14	Archivo CC	X	X		X			X									X		X	R			X			X			
		FQ.15	Contramuestras	X	X		X			X		X							X		X	R			X			X			
	MICROBIOLOGÍA	MI.01	Laboratorio General Mic.	X	X		X			X	X								X		X	R		X				X			X
		MI.02	Insumos Mic.	X	X		X			X		X							X		X	R		X				X			
		MI.03	LAL	X	X		X			X		X							X		X	R		X							
		MI.04	Preparación de Medios y Esterilización	X	X		X					X							X		X	R		X				X			
		MI.05	Lavadero Mic	X	X		X			X			X					X			X	R		X				X			
		MI.06	Control de Esterilidad	X	X		X					X							X		X	S		X				X			
		MI.07	Control de Esterilidad segregados	X	X		X					X							X		X	S		X				X			
		MI.08	Hall Control Esterilidad	X	X		X					X							X		X	S		X				X			
		MI.09	Vestidor CE	X	X		X					X							X		X	S		X				X			
		MI.10	Esclusa a Vestidor CE	X	X		X			X		X							X		X	S		X				X			
		MI.11	Control Higiénico	X	X		X			X		X							X		X	S		X				X			

Figura 5 *– Terminaciones -* ***Figura 6*** *– HVAC*

PLANILLA DE AMBIENTES - HVAC

Sector	Nº	Local	Zona ISO	Presión Pa	Renov. p/hora	Aire ext. %	Temp. ver.	Temp. inv.	Hum. %	Filt. final en local	UTA Nro.	M.P.	I.F.	Extracc. Local. m3/h polvo	Extracc. Local. m3/h gases	Extracc. Local. m3/h vap.	Observaci
LAB. MICROBIOLOGÍA	MI.01	Laboratorio General Mic.	9	+10	>15	SC	20+/-5	20+/-5	50+/-15		MI.01		X		360		
	MI.02	Insumos Mic.	9	+15	>10	30	20+/-5	20+/-5	50+/-15		MI.01						
	MI.03	LAL	9	+15	>15	30	20+/-5	20+/-5	50+/-15		MI.01		X		180		
	MI.04	Preparación de Medios y Esterilización	9	+15	>20	SC	20+/-5	20+/-5	50+/-15		MI.01		X		360	180	
	MI.05	Lavadero Mic	9	+5	>20	100	20+/-5	20+/-5	50+/-15		MI.01		X		160		
	MI.06	Control de Esterilidad	7	+30	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					ISO 5 bajo F
	MI.07	Control de Esterilidad segregados	7	+30	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.03	X		60			ISO 5 bajo F
	MI.08	Hall Control Esterilidad	8	+30	>20	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					
	MI.09	Vestidor CE	7	+45	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					
	MI.10	Esclusa a Vestidor CE	8/7	+30	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					
	MI.11	Control Higiénico	7	+30	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	mi.02	X					
	MI.12	Control de Higiénico segregados	7	+30	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.03	X		60			
	MI.13	Hall Control Higiénico	8	+30	>20	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					
	MI.14	Vestidor CH	7/8	+45	>25	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					
	MI.15	Esclusa a Vestidor CH	8	+30	>20	100	20+/-2	20+/-2	50+/-15	H14	MI.02	X					

PLANILLA DE AMBIENTES - ELECTRICIDAD

Sector	Nº	Local	Datos de equipamiento industrial: Equipo	Marca	Modelo	Serie	Máxima caga elect. Kw	Colocado en Mesada Nro.	Alimentación en emergencia	Suministros en el local: Iluminación (lux)	Antiactínica (lux)	Toma 220V común p/ servicios externos	Toma 220V tensión normal	Boca de FM	Toma tensión estabilizada	Caja FM con seccionador	Variador de Frecuencia	Descarga estática	Toma 380V IP65	Tomacorrientes 380/220v IP65	Tablero FM del equipo	Pariante	Instalación antiexplosiva	Teléfono	Tomacorrientes apto inst. antiexplosiva	Datos	Sirena de incendio c/ estrobe	Detector lónico	Avisador manual de incendio	Control de acceso	Enclavamiento de puerta	Luz emergencia	Luz de Salida	Observaciones
LAB. MICROBIOLOGÍA	MI.01	Laboratorio General Mic.	(1)				45	(1)		500	200	2	14	2	30	1	2	3	2		1	4		4		12	1	4	1			X	2	
	MI.02	Insumos Mic.								500		1	2															1						
	MI.03	LAL	(2)	(2)			12		X	500		2	4	1	2			1	1		1	1		1		1		1						
	MI.04	Preparación de Medios y Esterilización	(3)				5			500	200	2	8	2	15	1	1	1	1		1	2		2		6		2	1			X	1	
	MI.05	Lavadero Mic	(4)	(4)	(4)		12			500		1	6	1	2			1	1			1		1		1		1				X		
	MI.06	Control de Esterilidad	(5)	(5)	(5)		8		X	750	200		2		2			1	1	1						2		1			X	X		
	MI.07	Control de Esterilidad segregados	(6)	(6)	(6)		8		X	750	200		2		2			1	1	1						2		1			X	X		
	MI.08	Hall Control Esterilidad								500		1																2				X		
	MI.09	Vestidor CE								500																		1		X	X			
	MI.10	Esclusa a Vestidor CE								500																		1		X	X			
	MI.11	Control Higiénico	(7)	(7)	(7)		6			500	200	1	2		2			1	1	1						2		1			X	X		
	MI.12	Control de Higiénico segregados	(8)	(8)	(8)		6			500	200	1	2		2			1	1	1						2		1			X	X		
	MI.13	Hall Control Higiénico								500		1																1				X	X	
	MI.14	Vestidor CH								500																		1						
	MI.15	Esclusa a Vestidor CH								500																		1		X	X			
	MI.16	Incubación	(9)	(9)	(9)	(9)	14	(9)	X	500		1	8	2	8			4	4							4		1		X		X		
	MI.17	Oficina Resp. Mic.								500		1	4		2									1		2		1				X		
	MI.18	Oficina Mic								500		1	4		2									1		2		1				X		
	MI.19	Estufas Mic	(10)	(10)	(10)				X	500		1	8		4			4	4					1		1		1				X		

Figura 7: *Electricidad - .* ***Figura 8:*** *Sanitaria y especiales*

PLANILLA DE AMBIENTES - SANITARIA Y ESPECIALES

Sector	Nº	Local	Equipo o Ambiente	Consumo Lts/hora	Horas en Func.	Presión en bar	Suministros sanitarios: Agua Potable Fría (APF)	Agua Potable Caliente (APC)	Desagüe Hermético (DH)	Desagüe Abierto (DA)	Suministros especiales: Aire Comprimido Libre de Aceite (ACLA)	Vacío (VAC)	Agua Purificada (PW)	Gas Natural (GN)	Nitrógeno (N2)	Agua Refrigeración Industrial (ARI)	Agua de calentamiento ACI (ACI)	Vapor Industrial (VI)	Vapor Limpio (CS)	Otros Servicios . Ver Referencias (Otros)	Observaciones
LAB. MICROBIOLOGÍA	MI.01	Laboratorio General Mic.	A	(1)	(1)		10	8	4	4	10	4	4	3	5	2	2		1	(a)	
	MI.02	Insumos Mic.		(1)	(1)																
	MI.03	LAL	A	(1)	(1)		2	2	2	2	2	1	2	1	2				1		
	MI.04	Preparación de Medios y Esterilización	A	(1)	(1)		4	4	2	3	2	2	2	2	2	2	2		1	(b)	
	MI.05	Lavadero Mic	A	(2)	(2)	(7)	5	3	2	2	2	2	2		2						
	MI.06	Control de Esterilidad	A												1						
	MI.07	Control de Esterilidad segregados	A												1						
	MI.08	Hall Control Esterilidad																		(d)	
	MI.09	Vestidor CE																			
	MI.10	Esclusa a Vestidor CE	A				1		1						1						
	MI.11	Control Higiénico	A				1		1						1						
	MI.12	Control de Higiénico segregados	A						1						1						
	MI.13	Hall Control Higiénico																			
	MI.14	Vestidor CH																			
	MI.15	Esclusa a Vestidor CH	A				1		1						1						
	MI.16	Incubación	A		(5)	(6)	4		4												
	MI.17	Oficina Resp. Mic.																			
	MI.18	Oficina Mic																			
	MI.19	Estufas Mic	A	(3)	(4)		4		4												

En la Figura 7, los números indican la cantidad de los puntos de uso; y (XX) indica una referencia al equipo. Se agregan tantas líneas horizontales como equipos relevantes, marcando la necesidad de cada uno.

En la Figura 8, los números indican la cantidad de puntos de uso. Las características de las terminaciones deben responder a evitar el acumulamiento de suciedad, que sea fácilmente limpiable y lavable. Por tal razón es aconsejable que no existan ángulos rectos entre paramentos en sí, éstos con el cielorraso y con el piso. También las carpinterías y los vidriados, por la misma razón, es preferible que estén enrasados. Estas medidas son bien venidas en clase ISO 9, aconsejables en ISO 8 y obligatorias en ISO 7 y 5.

5. Medidas y formas

Trabajar con las medidas y formas de los ambientes es de la etapa de anteproyecto. Para ello utilizamos el Plan de Necesidades preparado.

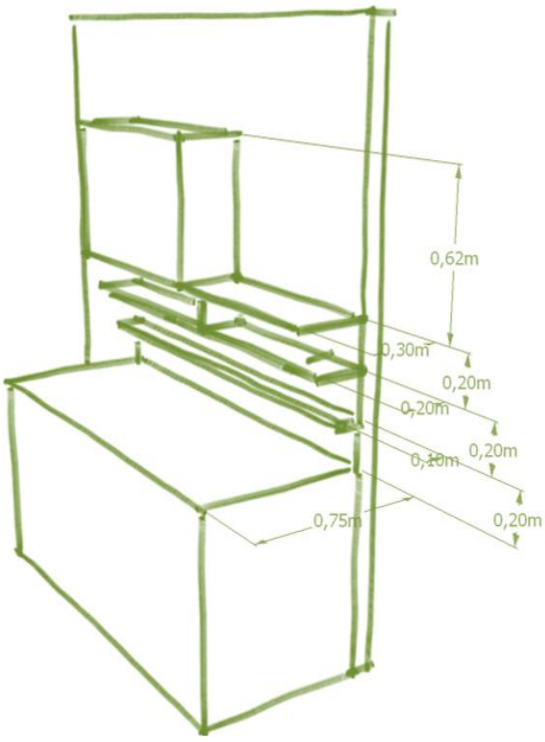
La proporción de cada ambiente hace a la armonía general, sin descuidar la necesidad funcional.

Una sala de más de 30 m^2, con una proporción de ancho/largo entre 1/1 y 1/1,5 debe tener una altura de 3 m. Una sala menor puede tener 2,40 a 2,70 m de alto según la función.

Como ejemplo, hay campanas importadas, diseñadas para alcanzar los cielorrasos de norma de los países de origen. Debemos tener en cuenta datos como estos en el anteproyecto.

Los muebles de laboratorio de producción estándar están modulados. Habitualmente las medidas de ancho de frente son 60 cm. Se usan submódulos de 15 cm para ajustes (Ver Figura 9) La profundidad de las mesadas y campanas que se usan (Ver Figura 10) son:

- Para uso común de apoyo y equipos pequeños: 60 cm
- Para uso general, con o sin piletas: 75 cm
- Para apoyo de equipos grandes o profundos: 90 cm
- Campanas y cabinas de bioseguridad 90 cm



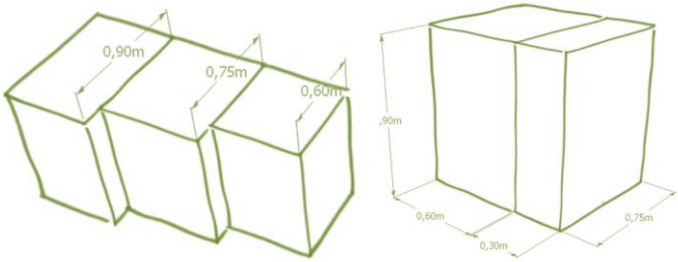


Figura 9 *– Módulos y sub módulos*

Figura 10 *– Profundidades*

Figura 11 *– Vuelo de estantes*

Los estantes y alacenas en general tienen hasta 30 cm de profundidad. Se disponen sobre mesadas ergonómicamente. A 15 cm de la mesada el vuelo del estante no será superior a 10 cm, a 30 cm de la mesada el

vuelo será hasta 20 cm y desde 45 cm de la mesada y hasta 1,80 m del piso, el vuelo no debe sobrepasar 30 cm. (Ver Figura 11)

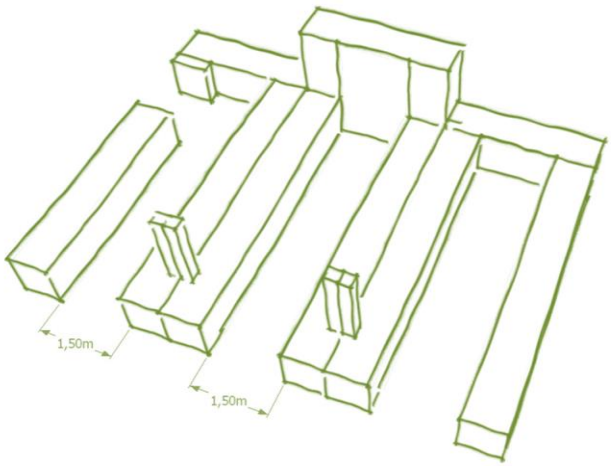
Las mesadas se pueden disponer de diferentes maneras; perimetrales, en forma de penínsulas o en islas.

Cada una tiene sus ventajas y desventajas. En general el aprovechamiento del espacio es mayor usando una combinación de perimetrales y penínsulas.

Como comodidad de trabajo, la forma de península es buena. Mejor aún es la forma de isla. En ambas los analistas no trabajan frente a una pared.

Se busca generalmente que las actividades de poca asistencia de personal se ubiquen hacia el fondo de la península y alejadas de las puertas y ventanas.

Figura 12 *– Distribución*



Las esquinas de los locales, con mesadas perimetrales crean espacios poco prácticos. Más si las mesadas son profundas. Se debe tratar de no tener esquinas encontradas de mesadas. La solución que optimiza el uso del mueble inferior, la mesada y los estantes superiores, es cortar una de las mesadas concurrentes 90 cm antes del encuentro. (Ver Figura 12)

Cuando las esquinas están ocupadas con muebles, terminan siendo ocupadas por equipos de muy poco uso, obsoletos y descartes de infinidad de materiales. Es dificultosa la limpieza y por esa razón termina discontinuándose.

En general las mesadas perpendiculares al aventanamiento reciben mejor iluminación natural. Las mesadas en paralelo a las ventanas arrojan sombra entre ellas y el personal puede tener deslumbramiento.

Se debe tener la precaución de ubicar convenientemente los equipos que necesitan atención especial, como el *service*, conexiones múltiples muy seguidas, desagües, ventilaciones, etc. También aquellos que necesitan condiciones particulares como, protecciones ante vibraciones, luz excesiva, temperatura estable, corrientes de aire, aislaciones acústicas o térmicas, etc.

Las separaciones entre mesadas enfrentadas deben ser superiores a 1,50 metros. Cuando una mesada está enfrentada con una pared, se podrá reducir a 1,20 metros. Cuando se enfrentan a muebles altos, dependerá del tipo de mueble, si es de hojas de abrir, será la suma de la hoja abierta más saliente con 0,90 metros. Ejemplo; hoja abierta de 0,60 m + 0,90 m = pasillo de 1,50 metros.

Las separaciones en cabecera son similares, aunque puede reducirse si no hay analistas que trabajan de frente en cabeceras. Medida mínima de paso de 1 persona; 0,90 m, para 2 personas 1,20 metros.

6. El proyecto

La etapa de proyecto es de desarrollo. Se plasma en documentos; planos y pliegos toda la intencionalidad. Se determinan en detalle las medidas de las salas, los muebles, los equipos fijos, y los móviles de gran tamaño.

El continente del laboratorio, con su estructura, muros y tabiques, cielorrasos, pisos y revestimientos, puertas, ventanas y vidrios, instalaciones de todo, es desarrollado a detalle para que pueda ser construido y probado.

Las salas de condición higiénica ISO 9, 8, 7 y 5 como sus instalaciones de servicio de aire acondicionado, aguas purificadas, aire comprimido, gases, electricidad, etc. deberán aceptar las certificaciones correspondientes a DQ, IQ y OQ.

La definición temprana del vuelco del efluente condiciona diseño, procedimientos y respuestas adecuadas.

Las condiciones de seguridad ante incendio y explosiones sean constructivas o funcionales serán atendidas con muros cortafuego, exutorios, hidrantes, rociadores, extinguidores, mantas, alarmas, duchas, lavaojos, protección ante derrames y lo necesario para la contención. Las vías de escape serán analizadas e implementadas en esta etapa. La protección al medio ambiente por derrames, vuelcos, expulsiones de gases, aires contraminados, olores, etc. es fundamental que sea considerado y dada la respuesta conveniente.

Terminado el proyecto, la construcción deberá desarrollarse sin alterar estas premisas.

7. Tipos de mobiliarios

A considerar el mobiliario, se prestará atención al tipo de sostén. Hay sistemas de muebles bajo mesada apoyados en patas, apoyados sobre banquinas, colgados de las mesadas o rodantes. Quizá los más ventajosos son los rodantes, por su facilidad de componerlos a gusto del usuario y prácticos al momento de limpieza y atención de servicios.

Los suspendidos de las mesadas, tienen la ventaja de dejar el piso libre para la más fácil limpieza. Los peores son los apoyados en banquinas, por su poca practicidad para modificaciones.

Figura 13 – *Tipo de sostén*

Las mesadas se sostienen de diferentes formas; apoyada en el mueble bajo, apoyada en patas rectas, en ménsulas tomadas de la pared o en estructura de pies con columna contra la pared integrada con una ménsula. Según el esquema de mueble bajo preferido se selecciona el sostén de mesada. La combinación de provisión comercial más acertada es rodantes y ménsulas. En esta combinación el espacio bajo mesadas es libre y acepta variadas combinaciones, aún con el laboratorio en funcionamiento. (Ver Figura 13)

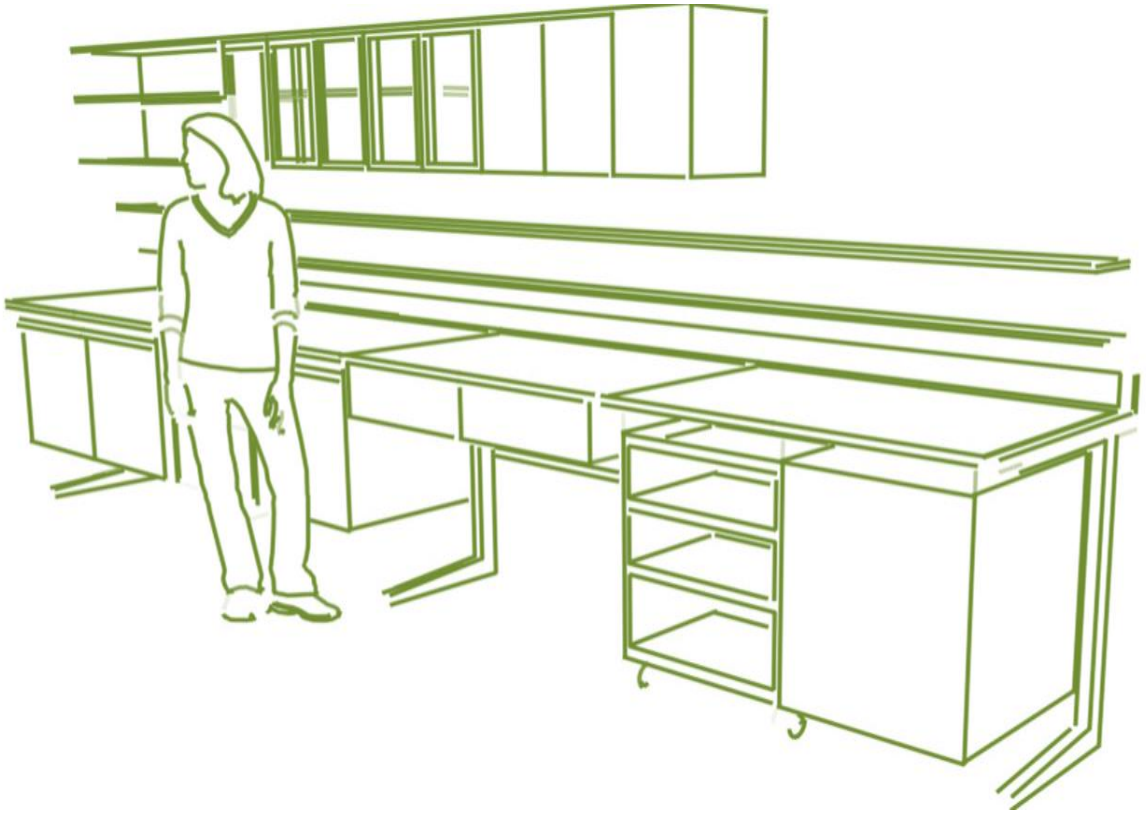
Los estantes y alacenas sobre mesada, en la generalidad son sostenidos de las paredes. En caso de islas, se sostienen entre las columnas de los servicios. En casos particulares se pueden colgar del techo. Esta última condición se debe decidir antes de la construcción de los cielorrasos.

Los muebles altos apoyados al piso, en algún caso podrán tener ruedas, que los hacen ventajosos por similares motivos a los apuntados. Existen muebles particulares por la función, como campanas, cabinas, archivos ignífugos, antiexplosivos, especiales para guardar corrosivos o solventes, deslizables para vidrios, antivibratorios para balanzas, guarda de elementos de seguridad, etc. No solamente los metros lineales de mesadas se tomarán en cuenta a la hora de definir superficies, sino también la variedad y cantidad de estos muebles.

Otro tema, son los equipos apoyados al piso que debemos considerar; heladeras, freezers, cámaras de estabilidad, estufas, autoclaves, carros, lavadoras, centrífugas importantes, etc.

Definir la arquitectura con distribución, tipo muebles y sostenes de mesadas, permitirá definir la distribución de servicios; si es espaldar sobre la pared bajo mesada, o sobre ella, o por cielorraso con bajadas encolumnadas o por racks suspendidos. Todas son prácticas. Lo ideal es que no sean embutidas en paredes o tabiques, ya que les restan flexibilidad a los cambios o de molestas reparaciones. (Ver Figura 14).

Figura 14 *– Mobiliario terminado*



8. Materiales para muebles

Existe mucha variedad de materiales para la construcción de muebles y sus terminaciones superficiales. Es bueno definir la calidad apropiada de terminación para cada sector del laboratorio, ya que los costos son muy dispares. Seleccionar lo mejor y que sea similar para todo es derrochar recursos.

Tanto los muebles de madera (reconstituida) o metálicos son aptos porque existen terminaciones superficiales para satisfacer la necesidad de uso y proteger su estructura. Es importante que todos los herrajes sean de muy buena calidad y que acepten una limpieza con los agentes habituales sin degradarse.

Las terminaciones para frentes de puertas (exterior o interior) más aptos son; vinílicos, melamínicos, pinturas horneadas, poliuretánicas o epoxis. Los estantes, salvo las necesidades especiales pueden tener las mismas superficies. El acero inoxidable también es conveniente, aunque más costoso.

Las mesadas pueden construirse según el uso exigido. Hay de melanina de distintas condiciones de resistencia, de resinas, de cerámica, de inoxidable, vitrificadas, etc. La variedad es amplia. Es habitual que se coloquen distintas mesadas, según la actividad.

Una forma de definir si las superficies de contacto son aptas para las actividades a que van a ser sometidas es experimentar muestras de materiales a los agentes más cáusticos, calor y cortes mecánicos.

Para la construcción de obra y muebles no existen materiales y mano de obra perfectos.

9. Complemento

Durante el proyecto y la construcción se deben considerar otros temas que influyen. He aquí una lista de ejemplos:

- Ubicación de los tubos de gases especiales, cercano a los puntos de uso y con *manifold* operable desde el laboratorio.
- Retiro de residuos, seleccionados según disposición final. Es muy práctico una esclusa al exterior, con *pass through* especiales para residuos.
- Depósito e ingreso de corrosivos y solventes, seguro, con antiderrame y cuba según cantidad acopiado. El consumo diario podrá estar dentro de muebles especiales.
- Control de fuego. Cercar las áreas críticas con tabiques cortallama y *dampers* cortafuego de conductos. El cierre de tabiques debe ser hasta la losa de hormigón o sobrepasar el techo metálico en medidas reglamentarias.
- En laboratorios de segregados y de bioseguridad, mantener permanentemente los flujos y presiones de aire. Cambio de filtros con sistema *bag-in bag-out*.
- Vías de escape. Tener la posibilidad de salida por extremos opuestos a vías seguras o al exterior.
- Lavaojos y duchas de emergencia. Instalados en lugares adecuados. Las duchas hacia los lugares de escape. Permanente control del agua de la cañería de lavaojos, colocando un servicio posterior de uso regular.
- Tener un lugar con los elementos de seguridad internos definido y señalizado.
- Vuelco contaminado. Crear un sistema de colección seguro con alarma de colmatación y fácilmente removible.
- En caso de utilización de materiales inflamables y/o explosivos, adecuar el diseño a protección del personal y libre vía de deflagración.
- En laboratorios de bioseguridad, implementar la escala de contención en forma segura y el control de los desechos.
- Cuidado del medio ambiente. Con filtrado y/o lavado de expulsiones de campanas o cabinas de bioseguridad. Con tratamiento de los efluentes peligrosos sólidos y líquidos traceables. Orientar la vena de aire de expulsión contraria a la toma de aire.
- Evitar el uso de extensiones eléctricas portátiles.
- Utilizar tomas eléctricos diferentes a los de uso común, para evitar el desconectado imprudente por el personal de limpieza para conexión de sus máquinas de aseo.
- Mantener carga de agua sobre los sifones de las rejillas que atienden equipos de uso poco frecuente.
- Control de la iluminación natural, para evitar resplandor que impida leer con comodidad pantallas electrónicas.
- Establecer los luxes necesarios con luz antiactínica y controlar la entrada de UV desde otras fuentes.

Capítulo III.2

Equipamiento: Calificación y Control

Graciela Torno

Introducción

Proceso de calificación de equipos analíticos

1. *Calificación del diseño*
2. *Calificación de la instalación*
3. *Calificación de la operación*
4. *Calificación del desempeño.*

Proceso de recalificación de equipos analíticos

Documentación

Bibliografía

Introducción

En el laboratorio contamos con una gran variedad de equipos y sistemas analíticos computarizados, desde simples centrífugas hasta tecnologías complejas, utilizados en procedimientos que finalmente nos ayudan a emitir datos que garantizan que los productos son aptos para el uso previsto.

La calificación de equipos analíticos carece en la actualidad de guías o procedimientos específicos. Existen opiniones encontradas en lo que se refiere a este tema. En este capítulo vamos a dar un enfoque científico de la calificación de equipos analíticos y la consideraremos como uno de los componentes principales requeridos para obtener resultados confiables y repetibles.

Cuál es la diferencia entre validación y calificación?

El término validación se utiliza para procesos de fabricación, procedimientos analíticos y de software; y el término calificación se emplea para equipos. Por lo tanto la frase calificación de equipos analíticos se usa para el proceso de garantizar que un equipo es adecuado para el uso al que está destinado.

Componentes de la calidad de los resultados analíticos

Existen cuatro componentes críticos involucrados en la generación de resultados analíticos confiables y repetibles. La calificación de equipos analíticos constituye la base para esta generación. Los otros componentes esenciales son: la validación del método analítico, las pruebas de aptitud del sistema y las muestras control.

A continuación describimos someramente cada uno de estos componentes.

(a) Calificación de equipos analíticos: Es el conjunto de pruebas documentadas utilizadas para corroborar que un equipo se desempeña adecuadamente para el uso previsto. Este es el punto que profundizaremos en este capítulo.

(b) Validación del método analítico: Es el conjunto de pruebas documentadas para corroborar que un procedimiento analítico es apto para el uso previsto.

(c) Pruebas de aptitud del sistema: Verifican que el sistema se desempeña de acuerdo con los criterios fijados en el procedimiento. Estas pruebas son utilizadas generalmente en cromatografía.

(d) Muestras control: Algunos análisis requieren también la inclusión de muestras control que brinden un aseguramiento continuo o durante el proceso de desempeño adecuado de la prueba.

Resumiendo, la calificación del instrumental analítico y la validación del método empleado contribuyen a la calidad del análisis antes de que los analistas lleven a cabo las pruebas. Las pruebas de aptitud del sistema y los análisis de muestras control ayudan a garantizar la calidad de los resultados analíticos inmediatamente antes o durante el análisis de la muestra.

Proceso de calificación de equipos analíticos

La calificación de equipos no es un único proceso continuo, sino el resultado de varias actividades diferenciadas, las cuales se las agrupa en 4 fases [(1)]. Es importante finalizar la fase anterior antes de pasar a la siguiente.

Las cuatro fases son: Calificación de Diseño (DQ), Calificación de Instalación (IQ), Calificación de Operación (OQ) y Calificación de Desempeño (PQ).

Algunas actividades de la calificación de equipos cubren más de una fase de calificación y los analistas pueden efectuarlas durante más de una de estas fases. Sin embargo en general se precisa un orden específico para las actividades de calificación. (Ver Tabla 1).

***Tabla 1**: Tiempo de ejecución, aplicabilidad y actividades para cada fase de la calificación de equipos analíticos*

Calificación de Diseño	Calificación de Instalación	Calificación de Operación	Calificación de Desempeño
Momento de aplicabilidad			
Antes de la adquisición de un nuevo modelo de equipo.	Durante la instalación de cada equipo, sea nuevo o existente sin calificar.	Después de la instalación o reparación importante del equipo.	Periódicamente, a intervalos especificados para cada instrumento.
Actividades			
En general se realiza juntamente con el fabricante, ya que antes de la DQ es necesario tener los requerimientos del usuario para que el fabricante pueda diseñar el equipo.	Descripción.	Verificación de parámetros fijos.	Establecimiento de pautas para el mantenimiento preventivo y reparaciones. Establecimiento de prácticas de operación, calibración, mantenimiento y control de cambios.
	Entrega del equipo. Montaje e instalación de los servicios necesarios. Verificación del entorno. Red y almacenamiento de datos.	Verificación de almacenamiento de datos, copia de seguridad y archivo seguros.	
Es necesaria la garantía de disponibilidad de soporte adecuado por parte del fabricante o del representante.	Verificación de la instalación del equipo.	Pruebas de las funciones del equipo.	Controles de desempeño

Descripción de las fases de calificación:

1- Calificación de diseño (DQ)

Antes de comenzar la calificación de diseño, el usuario debe definir las especificaciones funcionales y operacionales del equipo y los criterios para la selección del proveedor. En base a los "requerimientos de usuario", el fabricante podrá diseñar el equipo. La calificación de diseño (DQ) puede ser realizada no sólo por el que

desarrolla o fabrica el instrumento, sino también por el usuario. Por lo general el fabricante es responsable del diseño robusto y de mantener la información que describe como está fabricado y probado el equipo analítico antes de despacharse a los usuarios. Normalmente este control del equipo en fábrica es presenciado por el usuario.

2- Calificación de la instalación (IQ)

La calificación de la instalación es el conjunto de actividades documentadas necesarias para establecer que un equipo se entrega como fue diseñado y especificado y se encuentra debidamente instalado en el entorno seleccionado, y que además este entorno es adecuado para dicho equipo. La IQ se aplica a un equipo nuevo o usado o a cualquier equipo existente que no haya sido calificado. Partes relevantes de la IQ se aplican también a un equipo que haya sido transportado o esté siendo reinstalado por alguna razón.

Las actividades y documentación asociadas a la IQ son las siguientes:

(a) Descripción: Proporcionar la descripción del equipo o de las distintas partes del mismo, incluyendo el fabricante, modelo, número de serie y la versión de software. Utilizar planos y diagramas de flujo si es necesario.

(b) Entrega del instrumento: Asegurar que el equipo, y otros accesorios que el proveedor tenga que entregar, estén de acuerdo a lo especificado en la orden de compra, y que no hayan sufrido ningún deterioro debido al traslado. Verificar la entrega de manuales y planos correspondientes al mismo.

(c) Servicios/ instalaciones/ entorno: Verificar que el lugar donde será instalado el equipo cumpla satisfactoriamente con los requisitos ambientales solicitados por el fabricante. Verificar que los servicios se encuentren operando correctamente.

(d) Montaje e instalación: El montaje del equipo debe ser realizado por el fabricante e ingeniería o personal interno calificado. Cualquier hecho anormal observado durante el montaje e instalación deberá ser documentado.

(e) Almacenamiento de datos: Algunos sistemas analíticos incluyen sistemas computarizados o es necesario conectarlos a la red. En estos casos debe realizarse una calificación del sistema computarizado.

(f) Verificación de la instalación: Efectuar los diagnósticos y controles iniciales del equipo después de la instalación.

3- Calificación de operación (OQ)

Si el equipo posee instrumentos que son fundamentales para su funcionamiento, deberán ser calibrados previamente al comienzo de la calificación de operación. Por ejemplo, en un autoclave será necesario calibrar todos los instrumentos necesarios para medir o regular la presión y temperatura; antes de comenzar la calificación de operación del autoclave se deben calibrar los presostatos, los manovacuómetros, los sensores de temperatura. A su vez, debe verificarse que los instrumentos utilizados para las calibraciones y para la calificación del equipo, se encuentren calibrados.

Luego que la calificación de instalación ha sido aprobada, se realiza la calificación de operación, la cual consta de una serie de actividades documentadas, necesarias para demostrar que el equipo funcionará de acuerdo a la especificación operativa en el entorno seleccionado.

La fase OQ puede constar de los siguientes parámetros:

(a) Pruebas de funciones del equipo: Las funciones requeridas por el usuario deben probarse para verificar que el equipo funciona según lo previsto por el proveedor. Ejemplos:

- Si se trata de un baño termostático, en esta etapa se verifica si todas las teclas cumplen su función, es decir, si enciende el equipo, si al modificar la temperatura el equipo responde, si funcionan las alarmas, etc.
- Si se trata de una incubadora, se verifica el encendido, si aumenta la temperatura correctamente, si funcionan las alarmas, etc.
- En el caso de un autoclave se verifica su encendido, las alarmas, incluir al departamento de seguridad para que verifique los correspondientes parámetros, como las mediciones sobre las

válvulas. Se realizan corridas con sensores de temperatura externos (equipo calibrado) para verificar la distribución de temperatura en distintos puntos de la cámara, dependiendo del tamaño de la misma, etc.

- En el caso de una cabina de seguridad biológica o de flujo laminar, se realizan controles de integridad de filtros, recuento de partículas y control de velocidad de flujo [2].

(b) Almacenamiento de datos, copia de seguridad y archivos seguros: cuando corresponda, se debe probar el manejo seguro de los datos y su almacenamiento.

(c) En esta etapa debe efectuarse la redacción de los correspondientes procedimientos de uso, mantenimiento preventivo y control del equipo.

4- Calificación de desempeño (PQ)

Luego que la calificación de operación haya finalizado satisfactoriamente, se realiza la calificación de desempeño, la cual consta de una serie de actividades documentadas, necesarias para verificar que el equipo se desempeña de acuerdo a las especificaciones del usuario. Puede incluir los siguientes parámetros:

Controles de desempeño (PQ): Se establece una prueba o serie de pruebas, para verificar el desempeño aceptable del equipo para el uso previsto. Ejemplos:

- La PQ de un baño termostático o una incubadora puede incluir la verificación de la temperatura en distintos puntos del mismo (dependiendo del tamaño del equipo), a las temperaturas de trabajo y durante un tiempo determinado, con la carga habitual o la carga máxima que soporte el equipo.
- Si se trata de estufa de esterilización [3], además de la verificación de la distribución de la temperatura durante un tiempo determinado, se deben realizar los correspondientes controles con indicadores biológicos (*Bacillus subtilis*) en distintos puntos de la misma, los cuales se incuban a (37 ± 2) °C durante 7 días. Al cabo de este período se debe observar la ausencia de crecimiento en los medios de cultivo de los mismos. Durante la PQ de la estufa de esterilización deben realizarse ensayos de penetración del calor, colocando sensores de temperatura e indicadores biológicos dentro de los materiales a esterilizar.
- La PQ de una estufa de despirogenización [3,4], además de la verificación de la distribución de la temperatura en distintos puntos de la misma, debe incluir el control de eliminación de endotoxinas bacterianas. Este control consta en ubicar viales conteniendo una cantidad conocida de endotoxina bacteriana, realizar el ciclo de despirogenización correspondiente, retirar los viales y luego determinar la cantidad de endotoxinas bacterianas en cada vial. El test cumple si la reducción de endotoxina ha sido por lo menos 3 log de la cantidad inicial.
- La PQ de un autoclave [5] incluye la penetración de calor en los distintos ciclos que estén programados en la misma. En el caso que la carga no es constante realizar este control con la carga máxima, colocando los sensores de temperatura y verificando que la temperatura en estos puntos se mantiene dentro de especificación. Para la calificación inicial se realizan tres corridas por cada programa. También se deben incluir los correspondientes controles con indicadores biológicos (G*eobacillus stearothermophilus*) los cuales normalmente se colocan en los mismos lugares que los sensores de temperatura. Estos indicadores biológicos deben estar ubicados en el centro del material, por ejemplo dentro de Erlenmeyers o entre la ropa. Si se trata de una carga de líquidos, el indicador biológico utilizado puede ser ampollas conteniendo esporas las cuales son colocadas en el medio del recipiente que contiene el líquido a ser esterilizado.
- La PQ de un equipo volumétrico, por ejemplo un dilutor, debe incluir el control de los distintos volúmenes que dispensa. Se puede controlar cada volumen dispensando el mismo diez veces, tomando la pesada en cada uno de estos controles y luego calculando un volumen promedio que tendrá que encontrarse dentro de cierta especificación con una determinada desviación estándar porcentual.
- La PQ de una cabina de seguridad biológica o de un flujo laminar debe incluir el control de aire (control pasivo y activo) y control microbiológico de superficies que justifique que el procedimiento de limpieza y desinfección que se utiliza es el adecuado.

La calificación de desempeño de equipos en uso puede incluir las calibraciones realizadas durante los últimos años, es decir una calificación retrospectiva.

En la calificación de desempeño, debe quedar claramente explicitada, la forma en que se realizará la calificación, los puntos a muestrear y la especificación para cada una de las pruebas. También en esta fase de la calificación deben estar ya en vigencia los procedimientos de uso, mantenimiento, control y calibración, ya que después de la aprobación de esta etapa el equipo estará en condiciones de ser utilizado.

Proceso de recalificación de equipos

La recalificación es la repetición de un proceso de calificación o una parte específica de éste, luego de haber realizado el correspondiente control de cambio. Se realiza una recalificación cuando se produce un cambio en la ubicación de un equipo, luego de una modificación o reparación importante del mismo, u otra actividad que pueda modificar el correcto funcionamiento del equipo.

Documentación

Los documentos obtenidos durante la calificación del equipo deben conservarse de manera accesible. El primer paso necesario para realizar una calificación es la redacción del plan de calificación, el cual debe incluir la siguiente información:

- Numeración del plan: si hay varios equipos en un laboratorio, se asignará a cada uno un número de plan de calificación.
- Datos de equipo: Nombre, marca, modelo, origen, número de serie, etc.
- Firmas del personal que ejecuta el plan, lo controla, jefe o gerente del área de calidad con las respectivas fechas de las firmas.
- Plan de calificación de diseño, instalación, operación y desempeño. Estos planes incluyen en forma listada las distintas pruebas a realizar en cada fase, con su descripción, especificación, con una columna donde se registre si la prueba ha cumplido o no, y otra columna donde se registre la firma y fecha del que lo ha realizado. También es adecuado incorporar un espacio de observaciones para anotar algún detalle que no haya sido tomado en cuenta durante el plan y que ha tomado relevancia durante la ejecución de la calificación.
- Finalmente debe existir una frase de conclusión que deje constancia que el equipo cumple o no cumple la calificación y cuál es la fecha a partir de la que el equipo puede ser colocado en uso. Finalmente deben dejarse espacios para las firmas del personal que ha realizado la calificación (puede estar incluido el fabricante o el representante), la persona que ha controlado y el responsable de la unidad de calidad.

Una vez que el plan de calificación ha sido redactado y firmado por todo el personal que estará involucrado, puede comenzarse su ejecución. Se completa a medida que se realizan las distintas pruebas. Una vez finalizada la calificación, se define que el equipo puede colocarse en uso a partir de una fecha determinada. Tener en cuenta, que no sólo debe estar la calificación finalizada, sino los procedimientos de uso, mantenimiento y control del equipo en vigencia, y el personal capacitado.
A partir de este momento, cualquier cambio, reparación o mantenimiento realizado sobre el equipo debe quedar documentado en la correspondiente bitácora. Los cambios deben ser evaluados por el responsable del laboratorio, ya que tendrá que considerar si es necesaria una recalificación del equipo.

En el laboratorio debe existir un listado de todos los equipos que se encuentran en el mismo. Dicho listado debe incluir la descripción del equipo, marca, modelo, número de serie, el número de procedimiento de uso y mantenimiento, el número de procedimiento de calibración y si es un equipo GMP relevante, por lo tanto exige calificación, y cuál es su frecuencia. Hay equipos que no exigen ser calificados, como por ejemplo un mezclador por vórtice.

Los nuevos equipos cuentan con *audit trail*, lo cual permite tener registro de cada una de las actividades desarrolladas en el equipo, desde el encendido o apagado del mismo, hasta cada uno de los usuarios que ingresaron y las actividades que realizaron, o si se ha producido algún cambio, etc.

Si contamos con equipos que no cuentan con *audit trail*, tendremos que confeccionar una planilla (hojas numeradas), que incluya además de los datos propios del equipo, las actividades que se van realizando. Por ejemplo en autoclave, el horario de encendido, cada una de las cargas que se han esterilizado, incluyendo el horario, y la firma del operador que lo ingresó, hasta finalmente el horario de apagado del equipo.

Bibliografía:

1. USP Farmacopea 36. <1058> *Calificación de instrumentos analíticos*.
2. USP Farmacopea 36. <1116> *Evaluación microbiológica de cuartos limpios.*
3. PDA Technical Report Nº 3. *Validation of Dry Heat Processes: used for Sterilization and Depyrogenation*. Parenteral Drug Association.
4. PDA Technical Report Nº 7. *Depyrogenation*. Parenteral Drug Association.
5. PDA Technical Report Nº 1. *Validation of Moist Heat Sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control*. Parenteral Drug Association.
6. ISO 14644

Capítulo III.3

Filtros HEPA, flujo laminar y cabinas de bioseguridad

Mino Covo

Introducción

Definición de filtro HEPA

Elementos de los filtros HEPA

1. *Papel filtro o medio filtrante*
2. *Separadores*
3. *Marco*
4. *Adhesivos*
5. *Burletes*

Clasificación de los filtros HEPA

Ensayo de pérdidas donde el filtro se instala

Normas de áreas limpias. Reseña histórica

Áreas de flujo laminar

Equipos de flujo laminar

Campanas o cabinas de flujo laminar

Limitaciones del flujo laminar.

Procedimientos para el uso de los equipos de flujo laminar horizontal

Bioseguridad y filtración de aire

Uso y aplicación de los equipos para protección del operador y del ambiente

El ambiente de laboratorio de bioseguridad

Equipos clase I

Equipos clase II

Certificación

Gabinetes de alta seguridad clase III

Bibliografía

Introducción

En la construcción de los equipos de flujo laminar ya sean horizontales, de mesa, verticales, para producción de elementos estériles o de seguridad biológica, hay componentes que los constituyen, como los filtros HEPA, los ventiladores centrífugos, los prefiltros, y los gabinetes que alojan a los elementos antes mencionados. Todos estos

equipos generan corriente de aire filtrado unidireccional desprovisto de contaminantes, llamado flujo laminar. En todos los casos los gabinetes de flujo laminar tienen la doble función, de proveer aire libre de impurezas y a la vez barrer toda partícula generada dentro del gabinete para mantener al producto o al cultivo libre de contaminantes.

El filtro HEPA se ensaya con un aerosol con partículas de 0.3 micrones que por su tamaño se consideran las más difíciles de filtrar.

Para tamaños menores, las partículas se retienen por difusión browniana, y para las de mayor tamaño predomina la retención por inercia o intercepción directa. En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se ven los efectos de retención en fibras que constituyen los filtros de aire según los 3 mecanismos de retención.

Figura 1

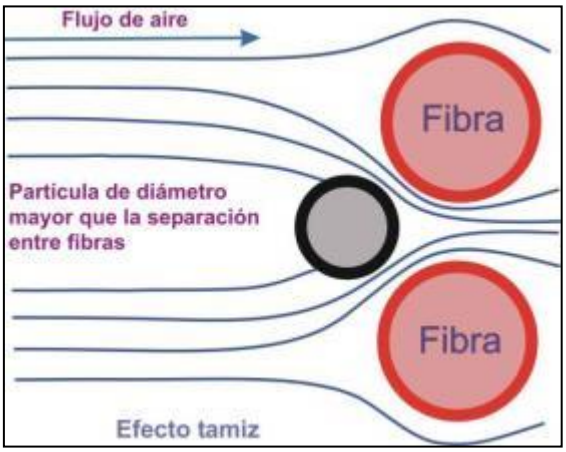


Figura 2

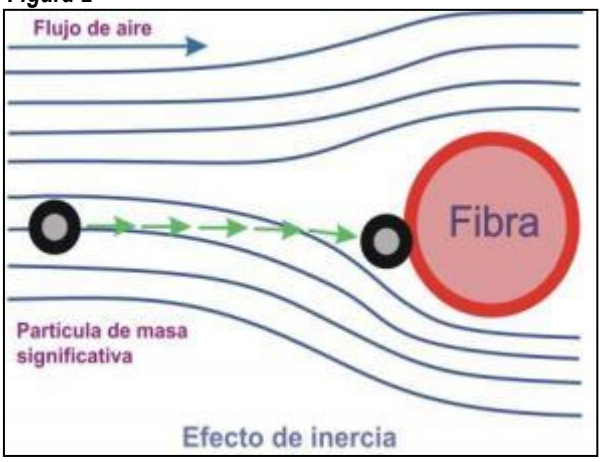


Figura 3

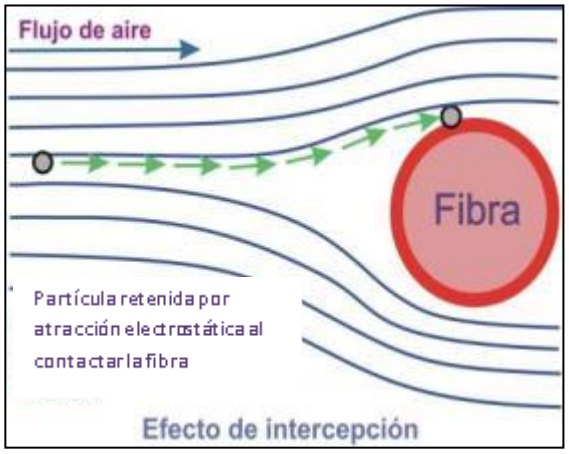
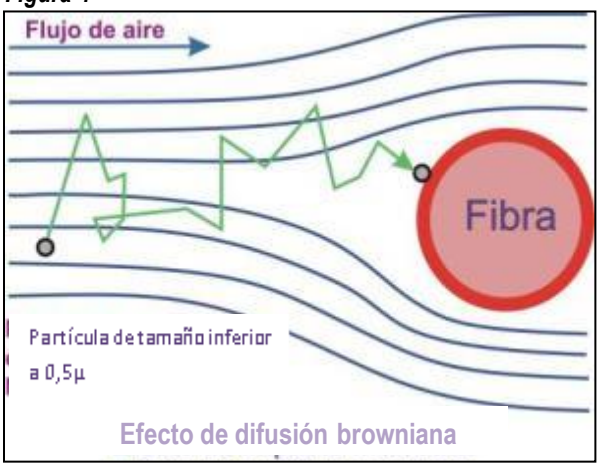


Figura 4

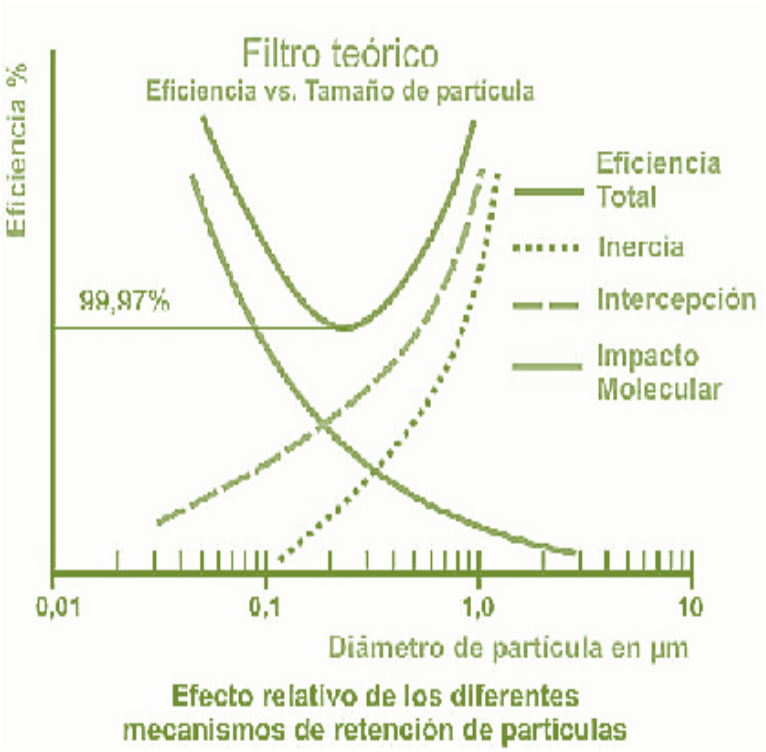


Para su certificación se desarrollaron los generadores de aerosoles de DOP de 0,3 micrones (µ) con los que se ensayan. El premio Nobel Langmuir [1] desarrolló esa teoría intentando determinar el tamaño crítico de los aerosoles a ser filtrados. Con el desarrollo de los contadores de aerosoles de rayo láser se vio posteriormente que la partícula más difícil de ser filtrada, o MPPS (*most penetrating particle size*) está en el orden de 0,12 a 0,18 µ. Sin embargo, el desarrollo de Langmuir era correcto pues las partículas de menor tamaño son retenidas con mayor eficiencia por el efecto de difusión browniana. Tan es así que hasta los aerosoles virales de centésima de micrón son retenidos con mayor eficiencia que los de DOP (dioctilftalato) de 0,3 µ. Ver Figura 5.

Definición de Filtro HEPA

HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) es un filtro descartable de medio filtrante seco y extendido dentro de un marco rígido, que tiene una eficiencia mínima de retención del 99,97 % equivalente a una máxima penetración de 0,03% en dioctilftalato D.O.P. de 0,3 µ, generado térmicamente, o un aerosol alternativo especificado.

Figura 5.



Efecto relativo de los diferentes mecanismos de retención de partículas

ELEMENTOS DE LOS FILTROS HEPA

Los componentes del filtro son 5:

1. Medio filtrante: Es papel corrugado con pliegues profundos y cercanos entre sí, de modo tal que permita un caudal de aire suficientemente grande. Puede llegar a usarse una superficie de papel hasta 50 veces mayor que la sección plana de entrada del filtro.
2. Separadores: Son elementos que mantienen los pliegues del papel separados, dando rigidez mecánica a la superficie filtrante.
3. Marco: Es la caja rígida dentro de la cual se halla el medio filtrante y los separadores.
4. Adhesivo: Es el producto que une el papel de filtro al marco
5. Burletes: Revisten la superficie del marco donde éste se une al soporte portante del filtro, dando estanqueidad al sistema.

1. Papel filtro o medio filtrante.

En las primeras tentativas de fabricación de materiales de alta eficiencia se utilizaron fibras relativamente groseras como soporte de fibras de amianto. Posteriormente, fueron hechos de papeles de celulosa y amianto, vidrio, amianto y vidrio, fibras plásticas y cerámicas.

El papel de celulosa y amianto fue el más barato de los medios filtrantes. En él las fibras celulósicas relativamente gruesas servían de soporte a las de amianto que son de diámetro de pocos micrones. Están en desuso por ser el amianto potencialmente cancerígeno.

El papel de vidrio es actualmente el más común de los medios filtrantes. Esto se debe a que la mayoría de sus microfibras es inferior al micrón. Con fibras plásticas se han fabricado medios de polietileno, polipropileno y nylon con diámetros de fibras entre 0,5 y 1,5 µ. Tienen buena compatibilidad química, pero poca resistencia a las altas temperaturas. Las partículas de materiales costosos se pueden recuperar disolviendo el medio filtrante para su separación.

Las microfibras cerámicas se utilizan cuando es necesario trabajar con altas temperaturas (hasta 1000 °C).

2. Separadores.

En los filtros HEPA la velocidad ideal del aire a través del medio es de 2,5 cm/ seg, o sea 1,5 m/ min, siendo con esta velocidad la caída de presión de 20 mm H_20 aproximadamente, y la penetración mínima inferior al 0,03% en partículas de 0,3 µ.

Para velocidades tan bajas es necesario aumentar la superficie efectiva del medio respecto a la sección del filtro entre 25 y 70 veces. Por ejemplo, en un filtro para 1700 m^3/ h de 0,36 m^2 de área frontal (filtro de 600 x 600 x 300 mm), la cantidad de medio filtrante es de 18 m^2 útiles. Esto es obtenido con pliegues continuos y profundos del papel, que se mantienen paralelos y espaciados.

Para evitar que los pliegues adyacentes se superpongan entre sí, se usan separadores que pueden ser de los siguientes materiales:

- Papel Kraft o cartón: son los más baratos, sin embargo tienen poca resistencia a la humedad y al calor.
- Aluminio: Resisten hasta 300 °C y son aplicados en filtros que deben ser resistentes a la humedad.
- Acero inoxidable. Son usados sólo en casos especiales
- Cordones adheridos al medio. Fabricantes europeos han desarrollado filtros donde el medio filtrante se mantiene separado por medio de cordones adheridos al papel para mantener su conformación lisa, con la ventaja de poder disponer de más medio filtrante por unidad de volumen. Pueden mantenerse así iguales caudales con menores caídas de presión.
- En la actualidad los separadores más usados son los de un adhesivo que se inyecta en la superficie del papel poco antes de ser corrugado y al secarse en el momento del plegado, aumenta la cantidad de pliegues obteniéndose un filtro de mayor superficie filtrante.

3. Marco

Inicialmente los filtros HEPA más comunes eran fabricados con marcos de madera aglomerada o terciada. Su mayor inconveniente era su poca resistencia a la humedad. La madera puede hincharse, desplazándose el burlete, perdiéndose la estanquidad y permitiendo fugas o pérdidas entre el burlete y el marco de sustentación. Se usan cuando es necesario incinerar el filtro una vez saturado.

Los marcos metálicos usados en la mayoría de las aplicaciones son de chapa galvanizada o cadmiada. Los marcos plásticos se usan en general en filtros de muy pequeño tamaño.

Actualmente, los filtros para equipos de flujo laminar y los módulos tienen perfiles de aluminio como marco.

4. Adhesivos

Una vez obtenido en la fabricación el medio filtrante corrugado se adhieren los extremos al marco por medio de adhesivos de los siguientes tipos:

- Adhesivos de tipo goma y siliconados: son los más comunes donde no se requiere alta resistencia a la temperatura.
- Adhesivos refractarios: para altas temperaturas.

5. Burletes

Los materiales usados para esta aplicación cumplen la función de evitar las fugas entre los filtros y la estructura portante. Según sus aplicaciones son de los siguientes tipos:

- Goma: solamente usados para bajas temperaturas.
- Neoprene: los más usados.
- Fibras de vidrio y minerales: se aplican donde se deben soportar altas temperaturas.

Es fundamental el buen cierre con los burletes, de lo contrario habrá pérdidas.

CLASIFICACIÓN DE LOS FILTROS HEPA

Si bien los filtros HEPA fueron inicialmente ensayados con DOP de 0,3 µ, por suponer que era la partícula más difícil de ser filtrada, después se descubrió que el aerosol de mayor penetración es de tamaño que fluctúa entre 0,1 y 0,2 µ.

Además se verificó con el desarrollo del flujo laminar, que filtros HEPA que cumplían con la definición de eficiencia, podían tener pequeñas pérdidas (*pin holes*) por las cuales entraría aerosol contaminante en cantidades mínimas. Por ello la norma IEST-RP-CC01.3 HEPA *and* ULPA *Filters* recomienda el ensayo de pérdidas por barrido del filtro HEPA con toma muestras, para su eventual reparación y sellado [6]

Cuando a un filtro HEPA certificado como de 99.97% en DOP, se le sellan las pequeñas perdidas (*pin hole*) su eficiencia aumenta llegándose así a tener filtros de 99,99% de eficiencia (Filtros HEPA tipo C y D), como se ve en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo IEST	Caudal Ensayo	Tamaño de partícula en µ	Eficiencia mínima %	Ensayado por pérdidas
A	Normalizado	0,3	99,97	No
B	Normalizado y 20%	0,3	99,97	No
C	Normalizado	0,3	99,99	Sí
D	Normalizado	0,3	99,999	Sí
E	Normalizado y 20%	0,3	99,97	Sí
F	Normalizado	0,1 - 0,2	99,999	Sí

ENSAYO DE PÉRDIDAS DONDE EL FILTRO SE INSTALA

Si bien todo filtro HEPA o ULPA debe ser ensayado individualmente en fábrica como control de calidad antes de su embalaje, es posible que cuando se lo instala pueda tener algún defecto de colocación o en el mismo filtro como se ve en la Figura 6. Por eso es recomendable el ensayo llamado DOP en frío, normalizado según la IEST, donde se define el aerosol ya sea como aceites minerales: Emery 304, aceite de maíz, etc. sustitutos de DOP aceptados[6]

Como se ve en la Figura 6 las pérdidas pueden ser debidas a defectos en el medio filtrante, al adhesivo que lo pega al marco, al marco metálico de soporte o a los burletes que deben asegurar su sellado.

Este ensayo consiste en generar un aerosol por medio de aire comprimido que entra en toberas (Laskin) sumergidas en el líquido que se aerosoliza (Figura 7).

La Figura 8 ilustra un tomamuestras que aspira el aire para llevarlo a un detector fotométrico de partículas que pueden haber penetrado el filtro. Una vez detectada la pérdida se procede a su reparación. Este aerosol que fluctúa en tamaño entre 0,2 y 2 µ con un tamaño medio de 0,7 se inyecta aguas arriba de los filtros con una concentración de 100 mg/ m^3 de aire.

Figura 6: *Pérdidas en filtros HEPA.*

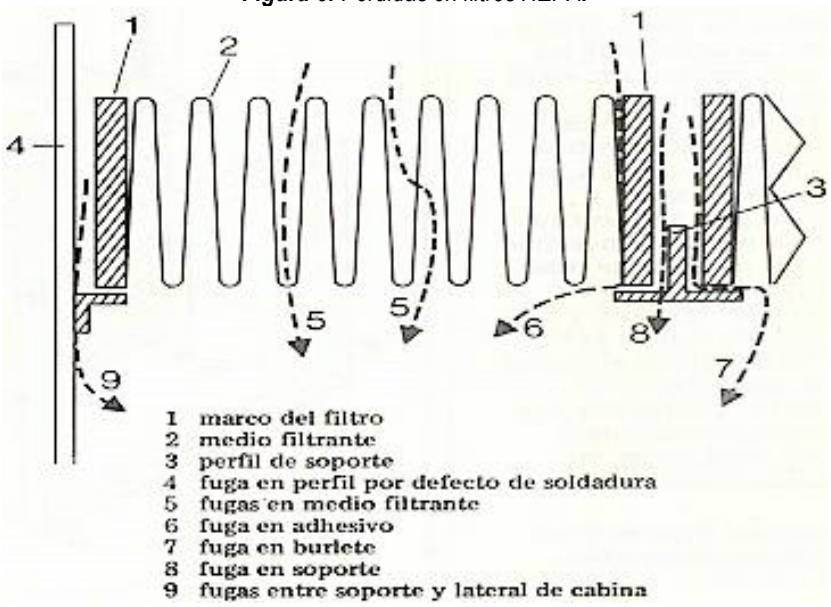


Figura 7: *Generación de aerosoles*

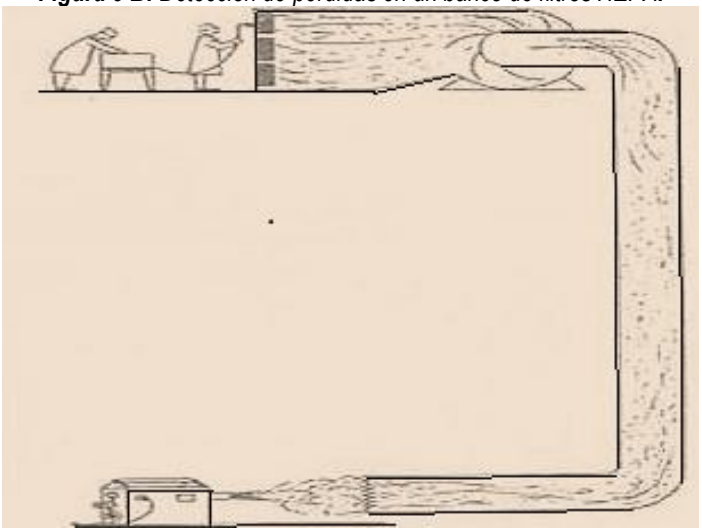
Figura 8: *Pérdidas en filtros HEPA –Tomamuestras*

La medición fotométrica de pérdidas consiste en calibrar el fotómetro al 100% de su escala con el aerosol generado y cambiando de escala de 100 a 1, detectando todo punto de donde la penetración supere el 0,01% de la concentración del aerosol inyectado por barrido de la superficie del filtro. La medición da una relación de concentraciones de aerosoles. Por supuesto, este ensayo de pérdidas es válido para aplicar en filtros de eficiencia ya certificada.

En las Figuras 9 A y B se muestran la verificación pérdidas en filtros HEPA

Figura 9 A: *detector fotométrico ATI*

Figura 9 B: *Detección de pérdidas en un banco de filtros HEPA.*



Velocidad de aire en equipos de flujo unidireccional Norma IEST-RP-CC002,2

La norma del *Institute of Environmental Sciences* IEST establece como velocidad en un equipo de flujo unidireccional horizontal (clean bench) 0,45 m/ seg +/- 0,05 m/ seg; 0,90 pies/ min +/- 10 pies/ min.

Para lo anterior es necesario el uso de un anemómetro de hilo caliente cuya máxima desviación standard sea del 15%. Ver Figuras 10 A y B.

Figura 10 A: *Medición de velocidad de aire con anemómetro de hilo caliente*

Figura 10 B: *Medición de velocidad con anemómetro de hilo caliente Alnor dentro de un equipo de seguridad biológica con conteo de partícula con contador de rayo láser PMS*

Normas de áreas limpias. Reseña histórica

Prácticamente todo el desarrollo de los sistemas de control de contaminación y áreas limpias aconteció a partir de fines de la década del 50. Los primeros desarrollos metódicos con normas específicas se debieron a la industria fotográfica y a los laboratorios de la Fuerza Aérea de EE. UU., donde ya se revelaban y ampliaban películas fotográficas o se fabricaban sistemas de guía para aeronaves y cohetes con la aplicación de giróscopos. Distintas normas se aplicaron para áreas en donde los requerimientos de limpieza de aire eran muy estrictos.

Al comienzo de estos desarrollos la Comisión de Energía Atómica de Estados Unidos, la NASA y el Comando de Cohetería y Misiles del Ejército comenzaron a requerir áreas limpias con conteos inferiores las 100.000 partículas por pie^3, es decir no más de 3.500 por litro. Con el lanzamiento de satélites por EE. UU. y la Unión Soviética en 1957 y 1958 la carrera del espacio había comenzado, y los sistemas de guías misilísticas empezaron a ser de tamaños mínimos. En consecuencia, con tripulaciones humanas enviadas al espacio, la confiabilidad de los equipos debía ser máxima, es decir, el porcentaje admisible de fallas debía tender a cero. La investigación y desarrollo para lograr áreas de contaminación controlada muy limpias se incentivó para mejorarlas, pero también para disponer de métodos de ensayo para certificar los controles de las mismas.

La primera norma que se utilizo fue la *Air Force Technical Order* # 00-25-203 en 1961. Trajo consigo dicha publicación de procedimientos para construir, operar y certificar áreas limpias, estableciendo cuatro clases de niveles de limpieza. En 1962 los Laboratorios Sandia de Albuquerque, New México, U.S.A, anunció el desarrollo de áreas de flujo laminar y en 1963 se editó la primera Norma Federal 209. Estas áreas fueron un gran avance en el control de contaminación al llegar a tener menos de 100 partículas por pie^3, es decir como máximo 3,5 por litro, lo que significa una reducción de 1000 veces del nivel de contaminantes de las primeras áreas limpias.

Luego en 1966, la primera área de flujo laminar fue instalada como sala de operaciones en Nuevo Méjico en EE. UU. y se revisó la Norma Federal 209 incorporando el flujo laminar. Se publicaron también normas adicionales y complementarias por ASTM y la Asociación Americana de Control de Contaminación AACC publicó la Norma CS-6 detallando los Métodos de ensayo y certificación de las áreas limpias en 1972. Años después, se forma sobre la base de la AACC el *Institute of Enviromental Sciences*, IES, que publicará la norma IES-RP-CC-006 sobre Ensayo en Áreas Limpias.

La norma Federal 209 fue la más comúnmente aplicada a través de sus diferentes revisiones, siendo la más usada la revisión 209D de 1988 y la 209E de septiembre de 1992. En ellas se especificaban los métodos para el recuento de partículas por tamaño con contadores fotométricos de rayo láser, así como los métodos para su certificación y validación incluyéndose los ensayos de los filtros HEPA. Ver Tabla 2.

Aparte de estas normas debe cumplirse con condiciones sobre nivel de iluminación, sonido, humedad relativa, velocidad de aire, número de renovaciones, etc. Actualmente todas estas normas han sido sustituidas por las ISO 14644 [7] en las que los recuentos de partículas se hacen por m^3 sustituyendo los recuentos que se hacían por pie^3

Tabla 2. *Federal Standard 209E*

Class Name		Class limits									
		0.1 µm		0.2 µm		0.3 µm		0.5 µm		5 µm	
		Volume units		Volume units		Volume units		Volume units		Volume units	
SI	English	m^3	ft^3	m^3	ft^3	m^3	ft^3	m^3	ft^3	m^3	ft^3
M 1		350	9.91	75.7	5.14	30.9	0.875	10.0	0.283	-	-
M 1.5	1	1 240	35.0	265	7.50	106	3.00	35.3	1.00	-	-
M 2		3 500	99.1	757	21.4	309	8.75	100	2.83	-	-
M 2.5	10	12 400	350	2 650	75.0	1 060	30.0	353	10.0	-	-
M 3		35 000	991	7 570	214	3 090	87.5	100	28.3	-	-
M 3.5	100	-	-	26 500	750	10 600	300	3 530	100	-	-
M 4		-	-	75 700	2 140	30 900	875	10 000	283	-	-
M 4.5	1 000	-	-	-	-	-	-	35 300	1 000	247	7.00
M 5		-	-	-	-	-	-	100 000	2 830	618	17.5
M 5.5	10 000	-	-	-	-	-	-	353 000	10 000	2 470	70.0
M 6		-	-	-	-	-	-	1 000 000	28 300	6 180	175
M 6.5	100 000	-	-	-	-	-	-	3 530 000	100 000	24 700	700
M 7		-	-	-	-	-	-	10 000 000	282 000	61 800	1 750

Tabla 3: *Tabla 1 de la Norma ISO 14644-1:2015*

ISO Class number (*N*)	Maximum allowable concentrations (particles/m^3) for particles equal to and greater than the considered sizes, shown below[a]					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
1	*10*[b]	d	d	d	d	e
2	100	*24*[b]	*10*[b]	d	d	e
3	1 000	237	102	*35*[b]	d	e
4	10 000	2 370	1 020	352	*83*[b]	e
5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	d, e, f
6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
7	c	c	c	352 000	83 200	2 930
8	c	c	c	3 520 000	832 000	29 300
9[g]	c	c	c	35 200 000	8 320 000	293 000

Áreas de flujo laminar

Dividiéndose las fuentes de contaminación en aire exterior y generación en el interior del aérea y solucionándose el primero de los problemas por la utilización adecuada de filtros HEPA, se buscó un mecanismo que sirviese para barrer la contaminación emitida interiormente.

Entre 1961 y 1962 un equipo científico encabezado por el Dr. Willis Whitfield, comenzó ensayando el envío de aire al local a través de filtro HEPA a mayores velocidades, lo que fue contraproducente. Pero luego se construyeron dos áreas, la primera formada por un cielorraso completo de filtros HEPA dispuestos horizontalmente y la segunda con una pared de filtros HEPA con circulación horizontal de aire sobre la mesa de trabajo.

Ensayando diversas velocidades de desplazamiento de aire se llegó a tener el área, llamada entonces clase 100 (hoy clase 5), es decir no más de 100 partículas por pie^3 o 3,5 por litro de aire de 0,5 µ y mayores. A ese mecanismo se lo denominó FLUJO LAMINAR por su semejanza al movimiento de ese tipo en mecánica de fluidos.

Ver en las Figuras 11 y 12 la representación esquemática de áreas de flujo laminar horizontal y vertical respectivamente. En ella las velocidades del aire en las superficies de trabajo son ligeramente menores que las habituales a la salida de los filtros y las líneas de desplazamiento se mantiene paralelas en todos sus puntos y uniformes en el espacio y en el tiempo. Evidentemente se había logrado el mecanismo de autolimpieza de las áreas limpias y se implementó la Norma Federal 209 B de la que resumiremos los conceptos fundamentales.

Figura 11. *Flujo laminar horizontal*

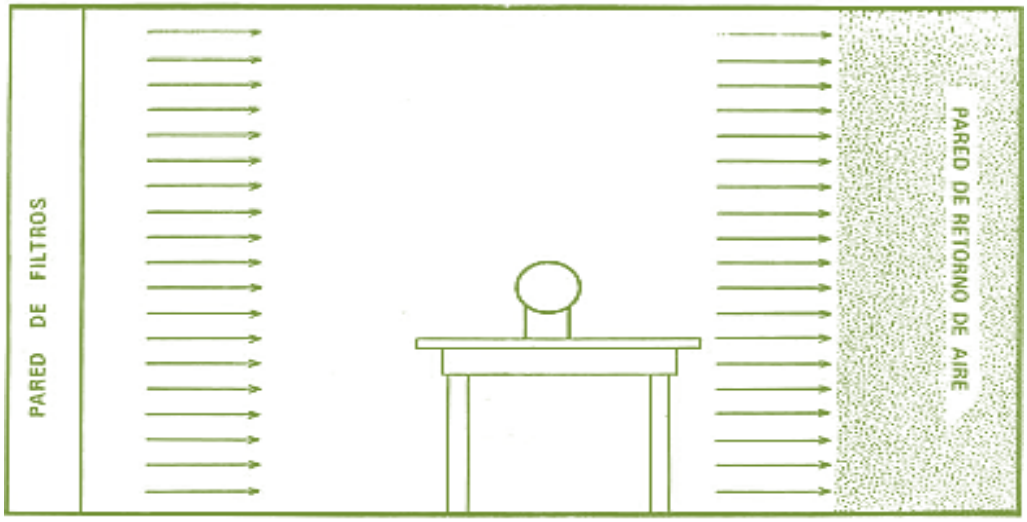
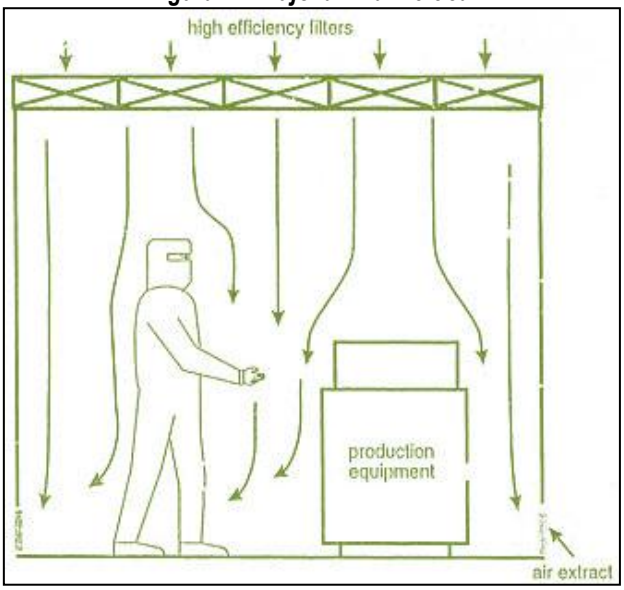


Figura 12. Flujo laminar vertical



Según la Norma 209, "*Se llama Flujo Laminar a una corriente de aire previamente filtrado por filtros HEPA cuya masa toda se desplaza en líneas paralelas a una velocidad uniforme de 90 pies/ min +/- 20 pies/ min (27metros/ min +/- 6 metros/ min)*".

Las velocidades de aire especificadas por la Norma han sido calculadas en función de poder expulsar de las áreas las partículas que allí se encuentran sin permitir su caída sobre los elementos en elaboración o de control. Así, el flujo laminar actúa como un pistón de aire limpio que se desplaza dentro de un cilindro barriendo fuera de las áreas las partículas en ellas generadas.

Las normas Fed Std 209 a y sus revisiones b, c, d definían las clases según el número de partículas por pie cúbico (cf). Recién con la norma Fed Std 209E se definieron las clases por unidades inglesas y métricas cft y m^3.

A partir del año 2000 se definen las normas ISO 14644 para áreas limpias donde se utiliza el sistema métrico internacional SI, definiéndose las clases según la fórmula:

$$C_n = 10^N \times \left(\frac{0.1}{D}\right)^{2.08}$$

donde

C_n representa la concentración máxima permitida en partículas por m^3 de aire, iguales o mayores que el tamaño de partículas considerado. C_n se redondea al número entero más cercano.

N es el número de clase ISO que no debe exceder el valor de 9. Los números ISO intermedios pueden ser especificados considerando a 0,1 como el mínimo incremento de N permitido.

D es el tamaño en micrones de la partícula considerada 0,1 es una constante

Las nuevas clases ISO pueden convertirse a Fed Std dividiendo por 35,2 el número de partículas por tamaño. Dividir por 35,2 convierte m^3 a pie^3. Por ejemplo la ISO 5 equivale a la vieja clase 100 por tener 3520 partículas en 0,5 µ y mayores por m^3.

Equipos de flujo laminar.

Mesadas de flujo laminar horizontal:

Cuando se controlan productos alimenticios, veterinarios y farmacéuticos, es común usar las mesas de flujo laminar horizontal llamadas vulgarmente "*clean-bench*".

Constan de un gabinete metálico con un banco de filtros HEPA dispuestos en un plano vertical, prefiltros, un ventilador centrífugo, una mesada plástica o de acero inoxidable y vidrios laterales con un techo de luces fluorescentes. El ventilador impulsa a los filtros HEPA aire ambiente que es aspirado a través de los prefiltros. El aire se desplaza entonces en líneas unidireccionales paralelas, perpendiculares a los filtros HEPA, barriendo cualquier contaminante generado sobre una mesada como si un pistón de aire estéril se moviera dentro del cilindro formado por un techo iluminado, la mesada y los vidrios o acrílicos laterales.

Estos equipos sirven para evitar que, al controlar la calidad microbiológica, el producto se contamine con bacterias, hongos o levaduras dispersas en el ambiente. Estos equipos se usan en industrias tan variadas como aguas minerales, gaseosas, vinos, cervezas, alimentos, productos farmacéuticos, etc.

Las áreas limpias y los gabinetes de flujo laminar cumplen dos funciones, la primera es proveer aire libre del contaminante exterior y la segunda es barrer con el contaminante generado por los individuos en el interior del gabinete. En la Tabla 4 se ilustra la cantidad de partículas generadas por los individuos.

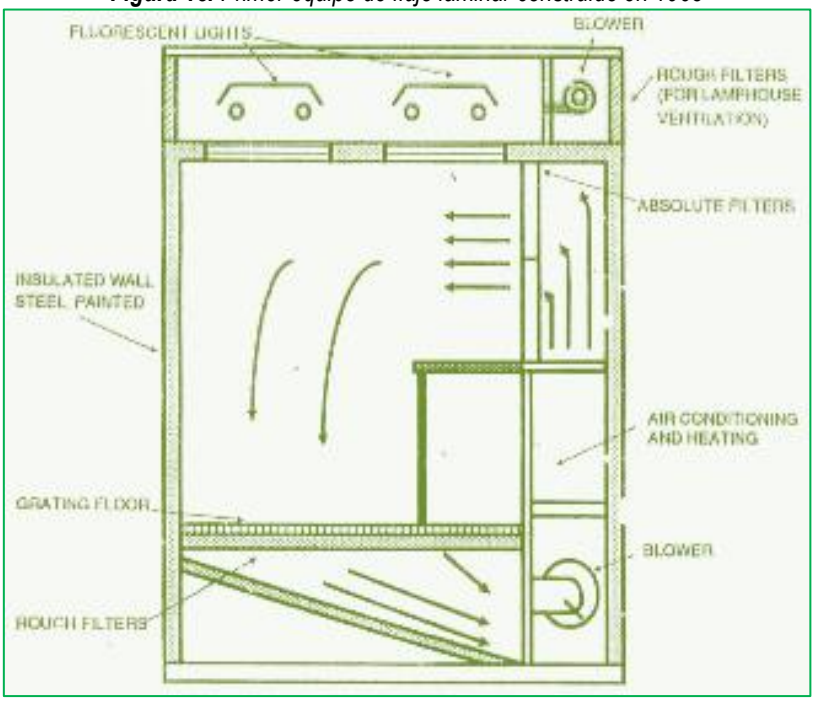
En el año 1963 un equipo liderado por el Dr. Willis Whitfield construyó el primer equipo de flujo laminar horizontal (Figura 13). Fue el gran descubrimiento porque con ello bajó el nivel de contaminación relativa mil veces con respecto a un área limpia convencional (clasificada entonces como clase 100.000 la convencional y clase 100 la de flujo laminar). Ver Tablas 2 y 3. Es decir de 100.000 partículas por pie^3 a 100 partículas por pie^3 equivalentes a 3500 por litro en oposición a 3,5 por litro.

Actualmente según norma ISO clase 5 significa 3520 partículas por m^3.

Tabla 4: *Contaminantes generados por los individuos por minuto*

Tipo de movimiento	Partículas por minuto (> 0,3 µ)
Sentado o parado inmóvil	*100.000*
Sentado con leve movimiento de cabeza brazos o manos	*500.000*
Sentado con leve movimiento del cuerpo	*1.000.000*
Al levantarse de una silla	*2.500.000*
Caminando a 0,9 m/s	*5.000.000*
Caminando a 1,6 m/s	*7.500.000*
Jogging a 8 km/h	*10.000.000*
Subiendo escaleras	*10.000.000*
Realizando ejercicios o corriendo	*15.000.000 a 30.000.000*

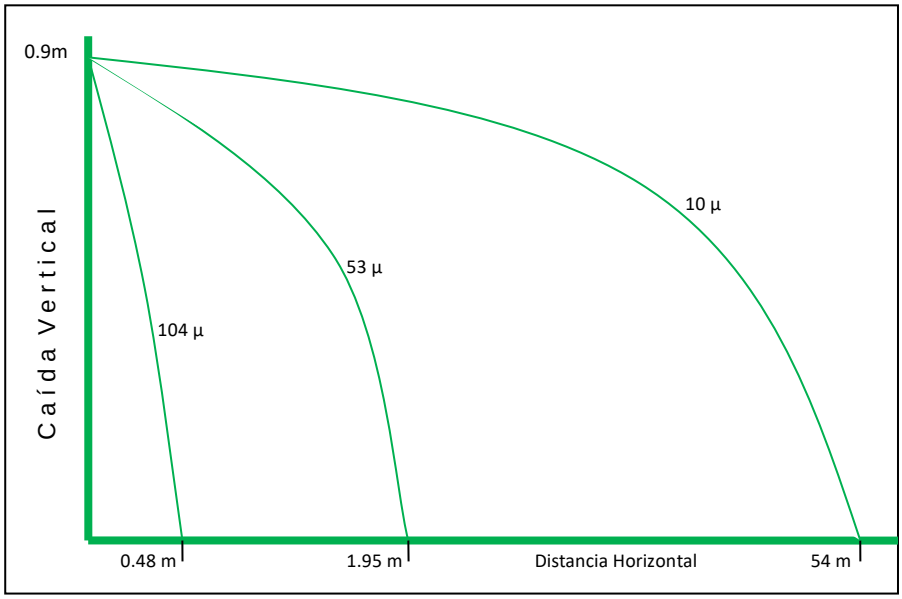
Figura 13. *Primer equipo de flujo laminar construido en 1963*



Se desarrolló entonces la norma 209 A que definía flujo laminar como una corriente de aire filtrado con filtros HEPA de una eficiencia mínima del 99,97 % en aerosoles de DOP de 0,3 µ que se desplaza a una velocidad de 90 pies/ min +/- 20 pies/ min (0,45 m/ seg. +/- 0,1 m/ seg).

La razón de esta velocidad se ve en la Figura 14, donde se ve el desplazamiento horizontal para diferentes tamaños de partículas. Se aprecia que una partícula relativamente grosera de 10 micrones se desplaza 54 metros en sentido horizontal antes de caer 0.9 metros en el sentido vertical. Es decir, la relación de desplazamiento horizontal con respecto al vertical es de 60 a 1. Si aplicamos esta relación de composición de movimientos a una mesa de flujo laminar horizontal cuya profundidad es de unos 50 a 60 cm y suponemos que de las manos del operador se desprende una partícula de 10 a 15 µ, ésta será barrida fuera del área de trabajo sin contaminar el material con el que se está trabajando.

Figura 14. *Desplazamiento horizontal para diferentes tamaños de partículas*



Los niveles de limpieza de estas áreas pueden demostrarse por el hecho de que no hay rayo de luz visible dentro de ambientes de esta clase. Si encendiéramos un proyector de cine en un extremo del área, solamente veríamos la imagen proyectada en la pared opuesta, sin distinguir el rayo de luz, dado que éste sería visible debido al reflejo de las partículas suspendidas en el aire.

Campanas o cabinas de flujo laminar

Las cabinas de flujo laminar se ubican sobre las zonas de envasado de productos que deben mantenerse libres de contaminación. En ellas el aire ambiente es aspirado por ventiladores centrífugos a través de los prefiltros, y se inyecta a través de un plano horizontal de filtros HEPA. El aire se desplaza entonces en una corriente vertical de líneas paralelas unidireccionales a una velocidad de 0,5 m/ seg, siendo las cortinas laterales las guías de flujo de aire. Toda llenadora de ampollas inyectables para uso humano debe ser provista de un flujo de aire clase 100 (ISO 5), es decir de una campana de flujo laminar.

Otros ejemplos de aplicaciones se dan en las usinas lácteas sobre máquinas envasadoras de yogurt, llenadoras de leche chocolatada y en las productoras de bebidas, en las llenadoras de aguas minerales, entre otros.

Independientemente de su configuración y tamaño, todos los equipos de flujo laminar horizontal tienen algo en común. Todo el plano vertical sobre la mesada está formado por filtros HEPA. La mesada, el techo de luces y los vidrios o acrílicos laterales constituyen guías para el desplazamiento del flujo de aire en forma unidireccional. Por esa razón, la manera correcta de trabajar en un área de flujo laminar es no interponiendo objetos entre el flujo y la zona crítica de trabajo.

El aire ultrafiltrado se desplaza como un pistón dentro de un cilindro, barriendo por su régimen laminar cualquier partícula generada en el interior del equipo. Todas las superficies son lisas, siendo la sección de salida de aire idéntica a la sección de filtros HEPA de entrada.

La función del prefiltro es aumentar la vida útil del filtro final. Se lo ubica en la sección de entrada de aire al ventilador y es fundamental cambiarlo cuando se acerca su punto de saturación. Figura 15.

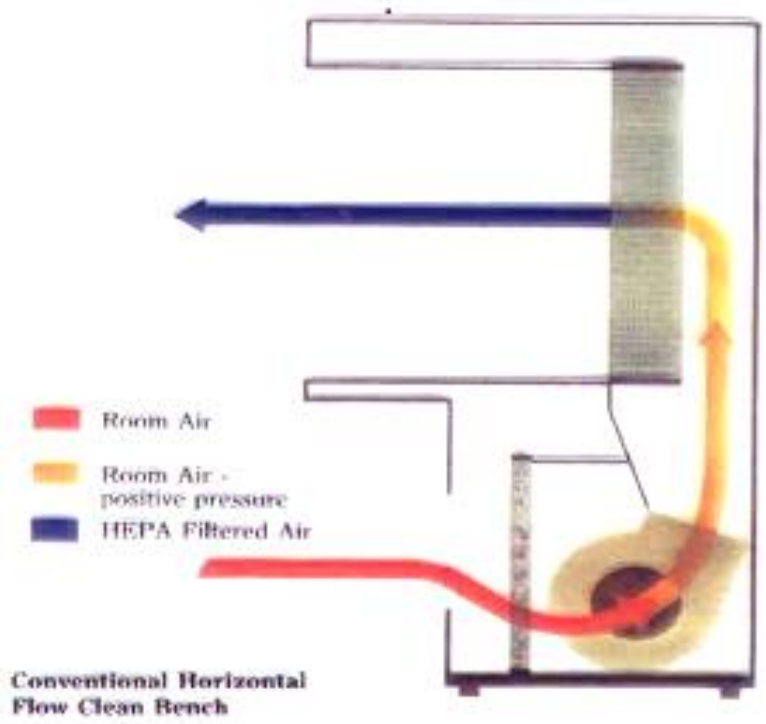


Figura 15. *Diagrama de flujo de aire en una mesa de flujo laminar*

Un ventilador centrífugo (Figura 16) provee la potencia para mantener el caudal de aire constante. Para ello se usan motores de velocidad variable (se aumenta la velocidad a medida que se ensucia el filtro) o, de no contar con estos motores, se opta por intercalar rejas de regulación de caudal que se irán abriendo a medida que aumente la caída de presión en el filtro HEPA, por su ensuciamiento. En el pleno, que es una cámara de presión, se distribuye la misma de manera de desplazar el aire uniformemente, asegurando caudal y velocidad facial constantes.

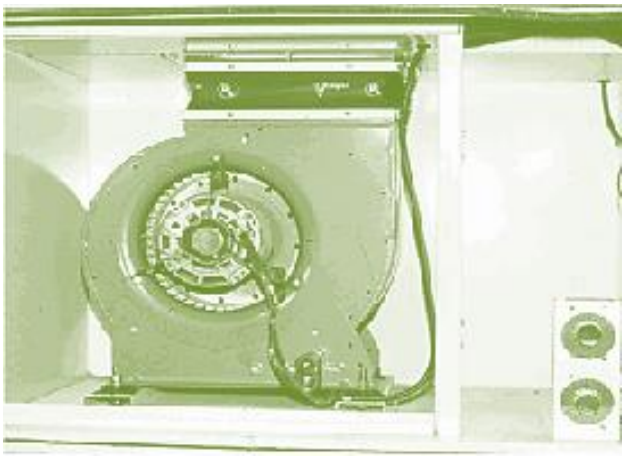


Figura 16. *Ventilador centrífugo*

Limitaciones del flujo laminar

El usuario debe entender las limitaciones del flujo laminar debidas a las turbulencias producidas por los materiales y el operador, que pueden originar contaminaciones:

Turbulencias originadas por interponer elementos entre el filtro HEPA y el producto:

Las turbulencias se originan cuando un objeto se interpone entre el banco de filtros HEPA y el producto. Un ejemplo obvio está ilustrado en la Figura 17. Partículas desprendidas de la mano pueden, en régimen turbulento, depositarse sobre el elemento estéril. La forma adecuada de trabajo es la que se muestra en la Figura 18.

Es importante que los objetos que deben ser mantenidos estériles estén bajo flujo laminar en la zona más limpia, es decir en un plano paralelo al banco de filtros HEPA dispuesto a unos 10 cm del mismo. Hay que considerar que el aire más limpio es aquel que más cercano se encuentra al banco de filtros HEPA.

Figura 17. *Incorrecto*

Figura 18. *Correcto*

Contaminación por movimientos transversales.

Tengamos en cuenta que la corriente de aire en flujo laminar es una tenue brisa. La norma indica 90 pies/ min ± 20 pies/ min como velocidad de desplazamiento de aire en régimen laminar, lo que equivale a aproximadamente 0,5 m/ seg, igual 1,80 km/ hora. Cualquier movimiento brusco originado por el operador puede desplazar aire transversal al flujo a una velocidad mucho mayor, lo que puede traer como consecuencia que partículas en un estrato del flujo laminar se desplacen sobre el producto estéril (Figura 19).

Figura 19. *Movimientos transversales*

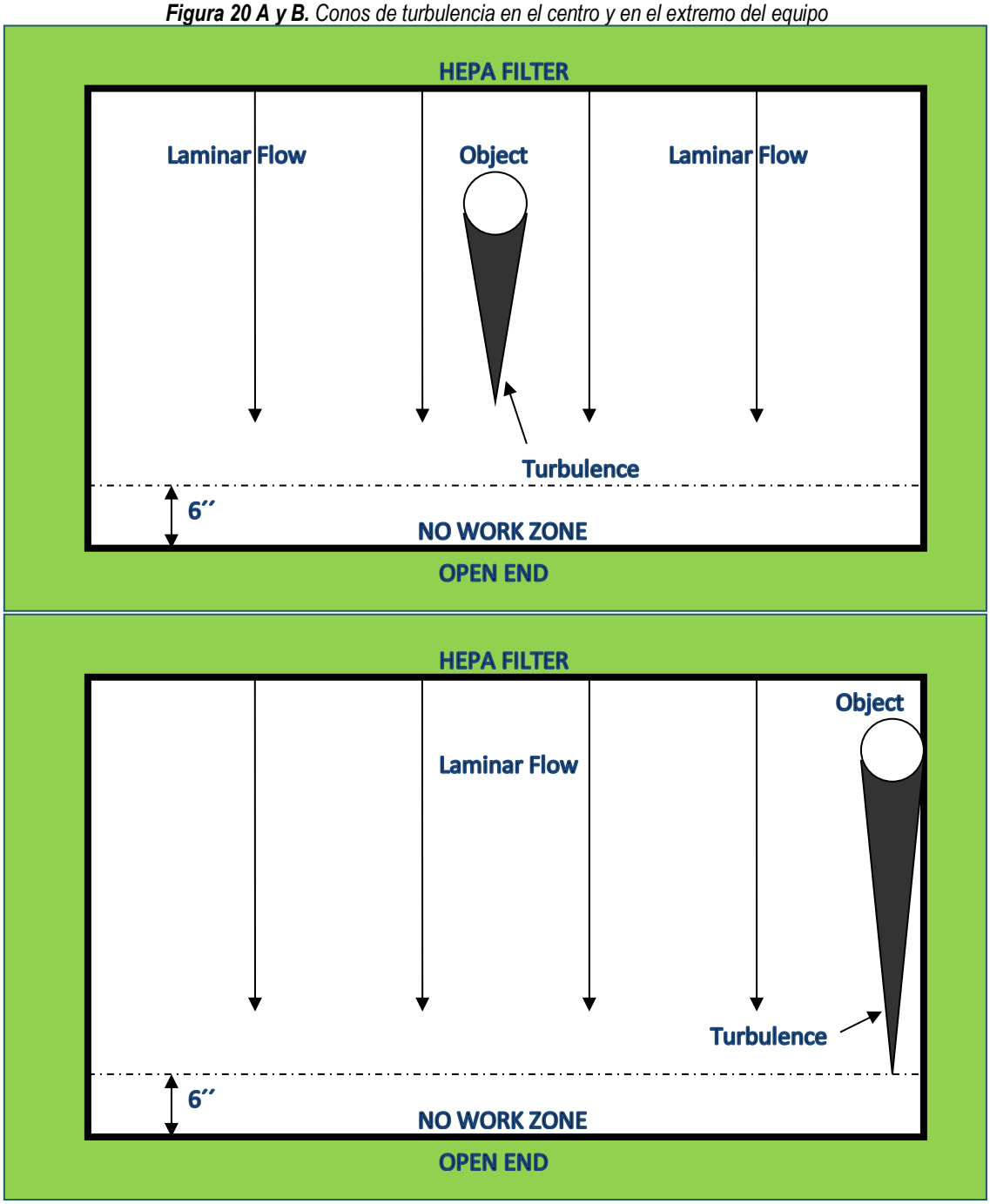
La contaminación generada por partículas desplazadas por corrientes de aire transversales al flujo, también pueden originarse en el área circundante al flujo laminar y produciría la entrada de contaminantes del ambiente al equipo.

Contaminación aguas abajo del flujo

Todo objeto colocado en una zona de flujo laminar genera una turbulencia en forma de cono, que se recompone a flujo laminar, a 3 veces el diámetro del objeto en el sentido del flujo. Cuando el objeto esta circundado por flujo laminar asimétricamente (de un lado solo) el cono de turbulencias será de 6 veces el diámetro del objeto

Lo anterior se ilustra en las Figuras 20 A y B, donde se ve que la altura del cono de turbulencias es proporcional al ancho del objeto; en el centro de la mesa el largo del cono es 3 veces el ancho del objeto, y en el caso de un objeto situado en el extremo del equipo, el cono de turbulencia tiene una altura 6 veces el ancho del objeto.

Figura 20 A y B. *Conos de turbulencia en el centro y en el extremo del equipo*



Veamos la consecuencia de tener un objeto dentro del flujo laminar, cuyo cono de turbulencias tiene el vértice exterior al equipo. La turbulencia toma una forma desordenada de movimientos de aire que origina la entrada de contaminantes del ambiente exterior. Lo anterior se visualiza claramente generando humo debajo de la mesada de flujo laminar (Figura 21), el que se introduce en sentido contrario al flujo dentro del cono de turbulencias hacia el objeto.

Estudios realizados con contadores demostraron que es muy difícil obtener clase 100 en el espacio limitado entre el borde exterior de la mesa y una línea paralela situada a 15 cm hacia el interior de la misma.

Los recuentos de partículas con que se hizo el experimento fueron realizados dentro de la mesa a 15 cm de su borde y en consecuencia se llegó a una primera conclusión: que ningún elemento debe ser colocado en esa área, más aún es conveniente que los elementos estériles estén dispuestos alrededor de 10 cm de distancia del filtro HEPA. Como método más seguro, debe considerarse que ningún elemento dentro del flujo debe tener el vértice del cono de turbulencias fuera del mismo. Mas aún, se aconseja para extremar precauciones que los vértices de los conos de turbulencias no sobrepasen la línea imaginaria dispuesta paralela al borde, a 15 cm del mismo. De esta manera se bajará al mínimo el riesgo de entrada de contaminantes externos.

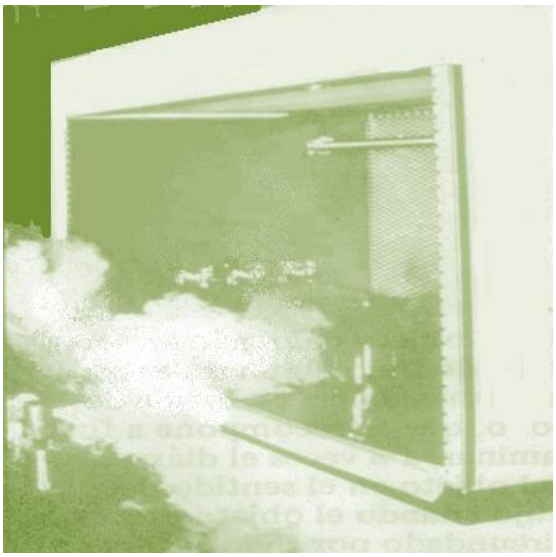


Figura 21. *Turbulencia en el exterior del equipo*

Procedimientos para el uso de los equipos de flujo laminar horizontal

A continuación damos una serie de recomendaciones prácticas para el uso adecuado del flujo laminar.

- Es primordial limpiar la superficie de trabajo del equipo con una solución de isopropanol al 70 %, utilizando para la limpieza una esponja o tela de material sintético que no desprenda fibras. Si el equipo no funciona las 24 horas, durante el tiempo de parada aerosoles ambientales pueden depositarse sobre su superficie. Este procedimiento de limpieza es elemental.
- Poner en marcha el ventilador y mantener el equipo en funcionamiento antes de empezar el trabajo. Esto permite eliminar todo riesgo de aerosoles ambientales en el interior del equipo. En muchos casos hay usuarios que mantienen los equipos en funcionamiento 24 horas por día evitando la necesidad de este procedimiento.
- El personal debe usar ropa adecuada que no desprenda fibras.
- En lo posible todos los productos no estériles introducidos en el equipo deben ser lavados o desinfectados con soluciones de isopropanol al 70 % antes de ser ubicados dentro del flujo laminar. Este procedimiento reduce la posibilidad de contaminación por contacto o para el posible desprendimiento de partículas de superficies contaminadas.
- Es fundamental un buen lavado de manos y uñas antes de colocarse los guantes.
- Debemos recordar que es conveniente ubicar los elementos estériles en un plano paralelo al del banco de filtros HEPA, a una distancia aproximada entre 3 y 10 cm del mismo y con separación entre los elementos que permita intercalar las manos. Recordamos una vez más que el vértice del cono de turbulencias no supere la línea de 15 cm (6”), dispuesta paralela al borde exterior de la mesa de trabajo.
- En los casos donde por el tipo de operación se deba introducir equipos o elementos que se interpongan entre el banco de filtros HEPA y los elementos críticos es fundamental que los equipos sean introducidos dentro de la mesada, tan limpios como sea posible, para prevenir el desprendimiento de partículas de los mismos.
- No efectuar movimientos bruscos dentro del flujo laminar es algo de extrema importancia, no solo por la perturbación del flujo de aire, sino además por la generación de aerosoles por el operador.
- Es importante evitar el uso de elementos puntiagudos apuntando hacia el filtro HEPA, por la posibilidad de perforar su medio filtrante, que es sumamente frágil.
- Evitar hablar mirando hacia el flujo, toser y estornudar.
- El uso de cosméticos debe ser evitado, particularmente el polvo facial, esmalte de uñas, sombras, etc. que pueden desprenderse en forma de aerosoles.

- Debe evitarse el uso de papel, telas, lápices y cinta adhesiva dentro del área de trabajo, por ser estos, elementos que generan contaminación por desprendimiento de partículas. Reemplazar por materiales que no desprendan partículas
- No usar el techo del equipo del flujo laminar para almacenar materiales, que originaran no sólo desprendimientos de partículas sino movimiento innecesario del personal.
- Mantener las actividades del personal en el área a un mínimo.
- Evitar la entrada de personal no autorizado a la cercanía del equipo.
- Mantener una rutina para el cambio de los prefiltros. Si éstos se saturan, provocarían una caída de presión tal que reduciría el caudal de aire a través del filtro HEPA, bajando la velocidad de desplazamiento por debajo de la admitida por la norma.
- Verificar periódicamente la velocidad del flujo laminar con un anemómetro de termocupla.
- Hacer el ensayo de integridad de los filtros HEPA cuando el equipo se instala, cuando el equipo se muda, cuando se transfiere a otra sección, o cuando ha tenido algún golpe, pues todas esas operaciones pueden provocar pérdidas en el filtro HEPA o en el burlete. Además es conveniente el chequeo de integridad acuerdo a la norma IES con una periodicidad que puede variar entre 6 meses y un año.
- Ubicación del equipo de flujo laminar: Es fundamental ubicarlo en una zona donde no hay corrientes de aire, lejos de puertas y de zonas con movimiento de materiales

El cumplimiento, que por demás es muy simple, de los requerimientos anteriores, asegurará un trabajo con muy buenos márgenes de seguridad, trayendo el máximo beneficio en su uso.

BIOSEGURIDAD Y FILTRACION DE AIRE

Uso y aplicación de los equipos para protección del operador y del ambiente

En los laboratorios de investigación bacteriológica y de virología, así como cuando se trabaja con citostáticos, se efectúan operaciones con materiales peligrosos para la salud, como cultivos de patógenos, virus, productos biológicos desconocidos en cultivo de tejidos, materiales cancerígenos, etc. En producción farmacéutica se trabaja con productos oncológicos, hipnóticos, etc. que demandan la protección del operador y del ambiente. Para el trabajo con estos productos son imprescindibles los equipos de seguridad biológica definidos según sean para la protección del operador y del ambiente del laboratorio solamente, o también para preservar al producto o cultivo del contaminante ambiental, manteniéndose entonces un doble compromiso. Hay que considerar el hecho de que en un 30% de los casos las causas de las infecciones adquiridas son desconocidas en cuanto al medio de transmisión. Las infecciones por causas conocidas son en su mayoría originadas por accidentes que son consecuencia de alguna forma de contacto directo, como inoculación o ingestión. Más difícil es reconocer las causas originadas por aerosoles patógenos generados por pipeteo, transvasado, centrifugación y manipulación de cultivos. El reconocimiento del peligro de las enfermedades e infecciones adquiridas en el laboratorio ha llevado a la necesidad de desarrollar métodos, procedimientos y equipos para llevar a un mínimo la exposición del operador a agentes infecciosos conocidos o potencialmente peligrosos.

Con el desarrollo de la ingeniería genética y los laboratorios de bioingeniería y ADN recombinantes, la necesidad de equipos confiables de bioseguridad se ha incrementado al máximo en especial en laboratorios donde se trabaja con agentes exóticos. La necesidad de aislación de estos con el ambiente exterior ha llevado al equipamiento de bioseguridad a cumplir con condiciones extremas. Sin ir más lejos, en nuestro país la erradicación de la fiebre aftosa hace que los laboratorios donde se trabaja con dicho virus sean sometidos a exigencias máximas. En casos de precauciones extremas se instalan dos filtros HEPA en serie, evitándose el riesgo potencial de pérdidas por uno de ellos, en la extracción del aire desde el laboratorio hacia exterior.

Actualmente se fabrican filtros ULPA (*Ultra Low Penetration*) definidos con eficiencias del 99.999% y 99.9999% en 0,12 µ. – o MPPS. Se ha verificado que el aerosol de mayor penetración no es como se creía de 0,3 µ, sino de 0,12 µ a 0,18 µ, pero las diferencias de penetración no son sustanciales, razón por la cual sigue utilizándose la vieja definición de filtro HEPA. La selección de equipos por sus clases I, II y III se hace en función de su riesgo,

basándose en la monografía de NIH (*Nacional Institute of Health*) y C.D.C. (*Center for Disease control*) [2] con agentes de riesgos con niveles 1, 2, 3, y 4, siendo el nivel 1 de mínimo riesgo y el de 4 de máximo riesgo.

- Nivel de riesgo 1: Agentes biológicos de los que no se conoce como causantes de enfermedades en adultos sanos. No se requiere generalmente equipos de seguridad biológica.
- Nivel de riesgo 2: Agentes asociados con enfermedades humanas. Peligrosas por: autoinoculación, ingestión, mucosas. Practicas: Uso de equipos de seguridad biológica clase I o clase II.
- Nivel de riesgo 3: Agentes biológicos locales o exóticos con posibilidad de contaminar por transmisión por aerosoles enfermedades que pueden tener consecuencias graves.
- Nivel de riesgo 4: Agentes extremadamente peligrosos y/o exóticos, infecciones que pueden transmitirse por aerosoles. En la práctica se utilizan únicamente equipos de seguridad Clase III (cajas de guantes) con cuidados extremos con el personal, incluyendo a veces ropas con escafandras con presión positiva. Se requiere esterilización de todos los residuos por autoclave o incineración y cambios de ropas esterilizadas.

El ambiente de laboratorio de bioseguridad

A diferencia de las áreas limpias utilizadas para llenado aséptico en la industria farmacéutica, que se encuentran en zonas con inyección de aire por filtro HEPA y presión positiva para evitar la posibilidad de entrada de contaminantes; donde se trabaje con patógenos el área deberá tener presión negativa.

La idea fundamental es que, en toda operación, sea de manipuleo, transvasado, agitación, centrifugación o pipeteo, habrá generación de aerosoles.

Cuando se trate de patógenos, deberá evitarse la posibilidad de su salida al exterior por el riesgo que ello implica. Para ello el gabinete de seguridad biológica, que llamaremos de primera barrera, deberá ser instalado en ambiente de laboratorio que llamaremos de barrera secundaria. Dichos ambientes como habíamos mencionado previamente, amén de presentar superficies lisas en paredes y pisos (con zócalos redondeados) que faciliten su limpieza y desinfección, deberán tener una extracción de aire a través de filtros HEPA, tal que produzca presión negativa en el ambiente. Se evitará el escape al exterior de aerosoles en caso de algunas aperturas, accidentes o pérdidas (Figura 22).

La mayoría de los gabinetes de seguridad biológica fueron utilizados para aislar al experimento del investigador[5]. Los equipos de aislación de áreas limitadas construidos fueron llamados Clase I, II y III por los laboratorios biológicos del ejército de los EE. UU., establecidos en Fort Detrick, los que hicieron la mayor parte del trabajo de desarrollo de estos equipos llamados inicialmente LFBSC (*Laminar Flow Biological Safety Cabinets*).

Equipos clase I

Los gabinetes de seguridad Clase I son básicamente campanas de extracción de acero inoxidable que usan un caudal de aire que se dirige del ambiente hacia la mesa de trabajo y de allí a un extractor con filtro HEPA, de manera de evitar la salida de aerosoles al ambiente del laboratorio.

La mayor desventaja del gabinete Clase I es que los materiales en experimentación son expuestos a los contaminantes ambientales que entran al gabinete con el aire ambiente. Más aún, el hecho de que el régimen de desplazamiento del aire sea turbulento, hace posible la contaminación cruzada dentro del gabinete (Figuras 23 y 24).

Los gabinetes Clase I son de seguridad parcial para trabajos con agentes de riesgo bajo o moderado, donde hay una necesidad de aislación para el ambiente y el operador, pero no para el producto. Permítasenos subrayar una vez más que el gabinete no aísla a los cultivos y materiales en experimentación de los contaminantes del aire ambiente del laboratorio. La mayor diferencia entre los equipamientos Clase I y las campanas de extracción de humos se debe al filtro HEPA, que es el elemento fundamental para evitar el escape de aerosoles al ambiente. La protección del personal se hace posible por el movimiento constante de aire desde el operador hacia el gabinete.

Figura 22.

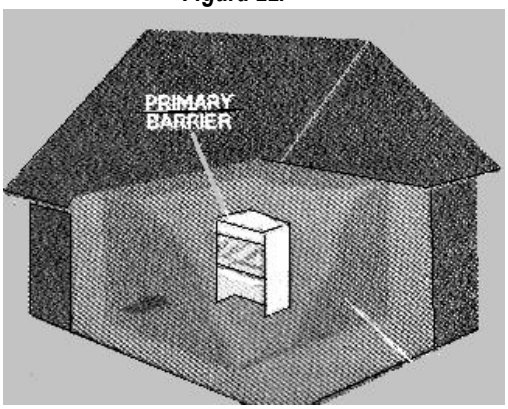


Figura 23.

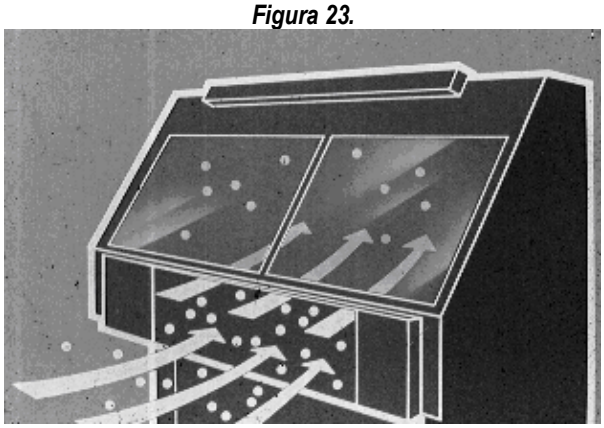
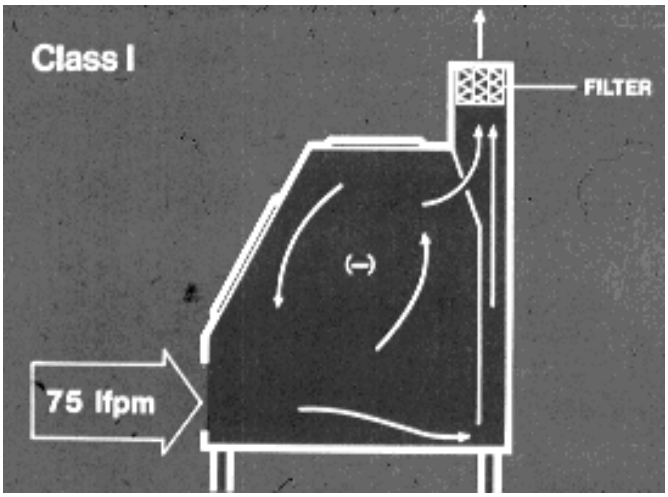


Figura 24.

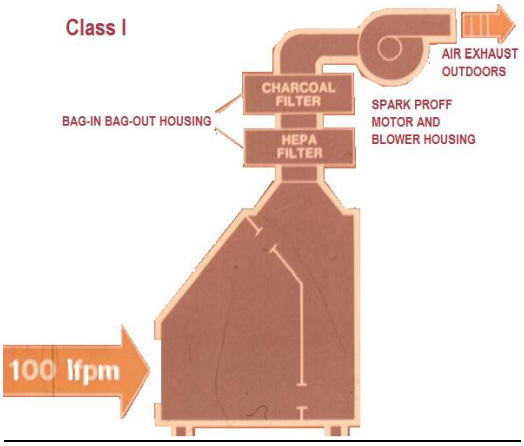


Como se muestra en el esquema de la Figura 25, el flujo controlado de aire en el área de trabajo evita la salida de los contaminantes por la abertura frontal dando protección al personal. Siendo el flujo de aire inducido por un motoventilador centrífugo que extrae el aire del gabinete, se genera una presión negativa dentro del mismo, evitando la salida del aire contaminado hacia el ambiente exterior.

A continuación del filtro HEPA puede tener en la extracción, un filtro de carbón activado para la eliminación de gases contaminantes que no son eliminados por el primero (Figura 26).

Figura 25: *Cabina Clase I*

Figura 26: *Cabina Clase I con filtro de Carbón activado*



Equipos Clase II

Es de extrema importancia considerar dentro de los equipos de seguridad biológica los equipos Clase II de *Flujo.* En estos se combinan dos necesidades o características: se protege al producto del operador y del ambiente; y se protege al operador y al ambiente del producto.

El equipo Clase II es de flujo laminar vertical pero el porcentaje del aire se recircula dentro del gabinete extrayéndose el resto por un filtro HEPA. La cantidad de aire extraído es equivalente al caudal de aire de entrada en forma de cortina que aísla el ambiente del gabinete del ambiente exterior. Una de las diferencias fundamentales del equipo de seguridad biológica Clase II vs. los equipos comunes de flujo laminar, es que éstos (sean de flujo horizontal o vertical) no aíslan de ningún modo al ambiente del laboratorio de los aerosoles generados por el producto que los impulsa por la corriente de aire estéril.

Si bien todos los equipos de seguridad biológica Clase II son de flujo laminar vertical, la inversa no es necesariamente cierta.

Hay equipos de flujo laminar vertical para protección del producto que no protegen ni al operador ni al ambiente como se muestra en la Figura 27. NO SON CLASE II.

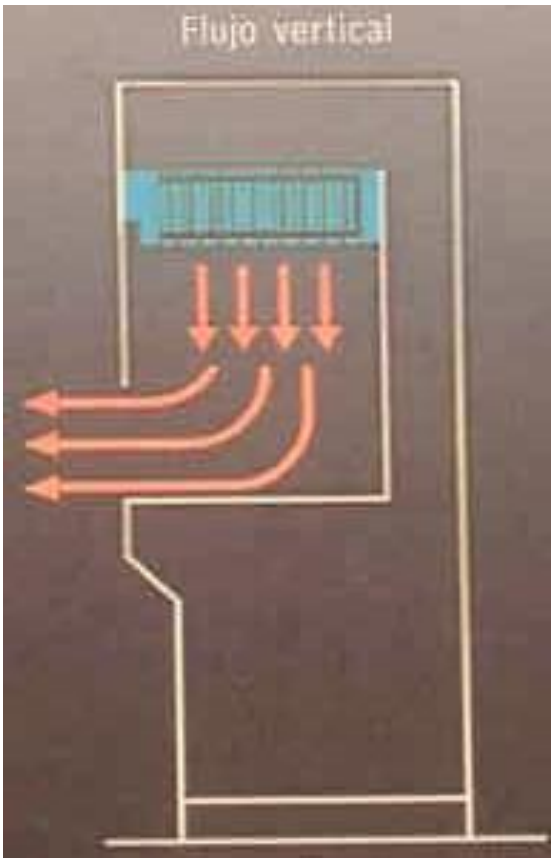


Figura 27

Gabinetes de seguridad biológica Clase II

Tipos de gabinetes

Desde el desarrollo de los primeros gabinetes Clase II, las modificaciones en los diseños han llevado a la designación de varios tipos de ellos. Esta clasificación ha originado una cierta confusión entre los usuarios, que trataremos de disipar en forma simple a continuación.

Es importante para el usuario seleccionar adecuadamente el gabinete, y especificar lo que corresponde para su compra o licitación, y que sepa elegir el equipo más adecuado para su trabajo. De allí la importancia del conocimiento de las distintas alternativas. Como ejemplo de la confusión, siendo los equipos de seguridad biológica Clase II de flujo vertical, en varias oportunidades se han hecho especificaciones en donde lo único que se menciona es "gabinetes de flujo laminar vertical", sin dar las características y especificaciones de los equipos Clase II que tienen normas reconocidas internacionalmente como las NIH 03/112 y la NSF 49 [4]. Errores groseros, como el mencionado anteriormente, han resultado en la aplicación de gabinetes de flujo laminar común sin ninguna protección para el operador ni para el ambiente. En ese caso el flujo de aire se transforma en el vehículo de los aerosoles patógenos hacia su exterior.

Todos los equipos Clase II tienen en común la succión por una reja perforada que induce una cortina de aire, impidiendo la entrada o salida de aerosoles por la abertura frontal del equipo. La abertura frontal es de aproximadamente de 20 cm a lo largo de la mesa de trabajo. Las grandes diferencias entre estos equipos consisten en el porcentaje de aire recirculado y el aire de extracción.

La más práctica y entendible clasificación de los gabinetes Clase II es la que se describe en la Tabla 5.

En casos de generación de gases y vapores que no son retenidos por el filtro HEPA será necesario que la recirculación del aire sea mínima o nula, porque de lo contrario aumentará la concentración gaseosa en la zona de trabajo. Por otro lado, también es importante definir la salida del aire de extracción. Cuando se generan vapores o gases es necesario que el filtro de extracción esté conectado al exterior del edificio por conductos, para no contaminar el ambiente del laboratorio.

***Tabla** 5. Clasificación de gabinetes de Clase II.*

NSF Nueva clasificación, adoptada 2002	NSF Clasificación Previa	Descripción General
A1	Clase II Tipo A	▪ 70% aire recircula; 30% aire extraído de un pleno común al ambiente del laboratorio ▪ 75 FPM cortina de aire de entrada (22,5 m/min) ▪ Pleno contaminado biológicamente bajo presión positiva
A2	Clase II Tipo A/B3	▪ 70% aire recircula, 30% aire extraído de un pleno común al ambiente del laboratorio ▪ 100 FPM cortina de aire de entrada (30m/min) ▪ Pleno contaminado biológicamente bajo presión negativa, o circundado por presión negativa
A2	Clase II Tipo B3	▪ 70% aire recircula,30% aire extraído de un pleno común a un sistema de extracción del edificio al exterior ▪ 100 FPM cortina de aire de entrada (30m/min) ▪ Pleno contaminado biológicamente bajo presión negativa o circundado por zonas de presión negativa
B1	Clase II Tipo B1	▪ 40% aire recircula, 60% extraído del gabinete ▪ Aire extraído llevado a un ducto de extracción al exterior del edificio ▪ 100 FPM cortina de aire de entrada (30 m/min) ▪ Pleno biológicamente contaminado está bajo presión negativa o circundad por zonas con presión negativa
B2	Clase II Tipo B2	▪ 0% aire de recirculación, 100% aire se extrae del gabinete ▪ Aire de extracción se expulsa a través de un ducto al exterior del edificio ▪ 100 FPM cortina de aire de entrada (30 m/min) ▪ Todos los ductos y plenos están bajo presión negativa ▪ Todos los ductos contaminados están bajo presión negativa o circundados por ductos de extracción, o plenos bajo presión negativa

Los equipos tipo A pueden estar conectados al exterior del edificio o tener la extracción al ambiente del laboratorio. En cambio, todos los equipos tipo B tienen extracción al exterior del edificio.

Extracción vs. Recirculación

Las mayores diferencias entre el tipo A, el tipo B y los gabinetes 100% extracción se deben al porcentaje de aire que es extraído o recirculado, y la manera en la cual el aire de extracción sale de la zona de trabajo. La Tabla 5 da una explicación.

El gabinete tipo A tiene un 70% de aire en recirculación constante, mientras un 30% es extraído del gabinete por medio de un pleno común.

En el tipo B1 30% del aire es recirculado y 70% es extraído directamente fuera de la zona de trabajo a través del ducto al exterior.

Finalmente en los gabinetes B2 hay 100% extracción y no hay recirculación, todo el aire es extraído directamente del área de trabajo hacia fuera del gabinete.

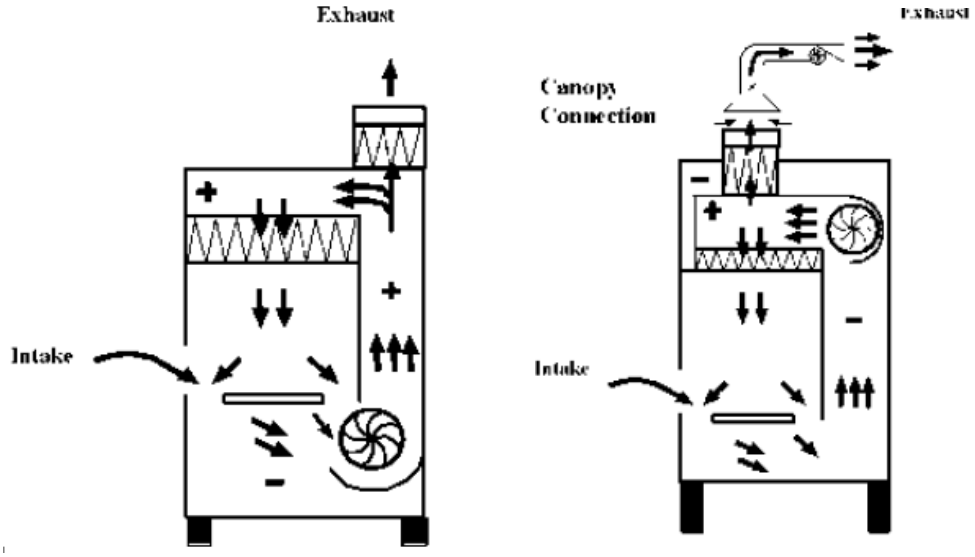
Gabinetes Clase II – Tipos A1 y A2

En los gabinetes Clase II Tipo A1, tales como Sterilgard (Figura 28), el 30% del aire se extrae del filtro HEPA de extracción mientras el restante 70% se recircula a través del filtro HEPA de inyección al área de trabajo.

Figura 28. *Gabinete clase II tipo A1.*

La Figura 29 muestra la cortina de aire inducida, la que impulsada luego por el ventilador se bifurca en aire en flujo laminar sobre la mesa de trabajo, mientras que el resto es extraído por el filtro HEPA.

Figura 29: *Gabinete con salida al laboratorio (izquierda, A1) y con salida al exterior (derecha, A2)*



La salida de patógenos es evitada en la parte del frente del equipo por la cortina de aire, la que al mismo tiempo evita la entrada de aire contaminado a la zona de trabajo. En ambos equipos el volumen total es impulsado por el motoventilador al pleno. En el mismo, el aire se bifurca evacuándose un 30% a través del filtro HEPA de salida, entrando nuevamente al aire ambiente libre de partículas en el modelo A1, o expulsado al exterior del edificio por medio de conductos en el A2. El restante 70% del aire es impulsado a través del filtro HEPA de inyección y entra al área de trabajo estérilmente en régimen laminar.

Los equipos Tipo A2 pueden tener la extracción del aire a través del filtro HEPA de salida al interior del laboratorio o al exterior. Esto se indica en la Figura 30, donde se ven ambos casos. El esquema de la izquierda muestra un equipo con salida al interior del laboratorio mientras que el de la derecha muestra el mismo equipo con el filtro de salida conectado a una transición que lo une al conducto hacia el exterior

La velocidad de la cortina de aire inducida por el ventilador es 75 FPM (pies/ min) equivalente a 22,50 m/ min en A1 mientras que en A2 la velocidad de la cortina de aire es de 100 FPM (pies/ min) equivalente a 30 m/ min. Mientras en A1 el pleno contaminado está bajo presión positiva en A2 el pleno está bajo presión negativa, o rodeado bajo presión negativa.

Estos gabinetes no admiten trabajos con generación de gases o vapores, pues siendo la recirculación del aire del 70% estos se acumularían llegando a situaciones peligrosas.

Equipos clase II- Tipo B1

El gabinete Tipo B1 clásico extrae el 70% del aire, recirculando solamente el 30% del mismo. Su diseño obedece a evitar la acumulación de gases o vapores al extraerse al exterior del edificio el 70% del aire de entrada. La velocidad de la cortina de aire de entrada es de 100 FPM (30m/ min). Además este gabinete incluye en su diseño tres elementos particulares, a saber:

1. Todo el aire de extracción es tomado directamente de la zona de trabajo y llevado por medio de un conducto al sistema de extracción central del edificio al exterior mediante un ventilador centrífugo situado en el techo.
2. El 30% del aire recirculado es filtrado a través de un filtro HEPA inmediatamente debajo de la superficie de trabajo antes de ser recirculado.
3. Todo el aire no filtrado fluye al gabinete bajo presión negativa. Todas las áreas de presión positiva están libres de inyección. Aclara la descripción anterior el diagrama que se muestra en la Figura 30, la que ilustra un corte de un gabinete Tipo B1.

Figura 30: *Gabinete tipo B1*

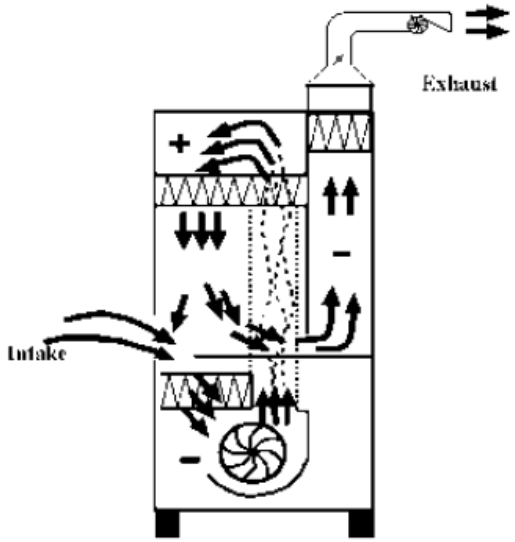
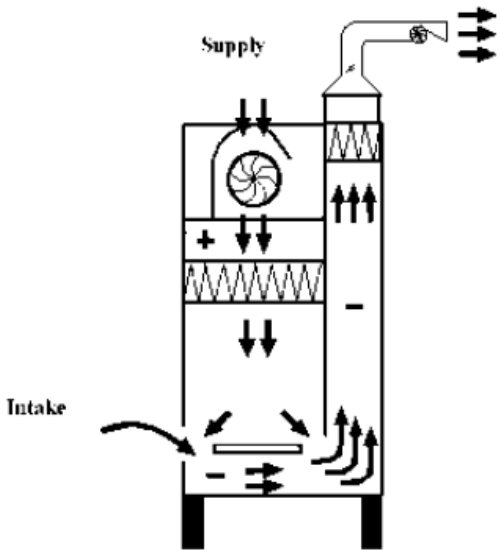


Figura 31: *Gabinete Clase II Tipo B2*



Equipo Clase II – Tipo B2

El segundo tipo de los gabinetes Clase II tipo B es de 100% de extracción total, como se ve en la Figura 31. Este tipo de gabinete es ampliamente utilizado en toxicología y en aplicaciones similares, en las cuales efluentes con productos químicos en fase gaseosa se encuentran presentes, pero el aire debe mantenerse en condiciones extremas de limpieza en cuanto a partículas.

El 100% del caudal de aire que pasa a través del gabinete va al exterior o donde el aire no origine riesgos. No hay recirculación del aire dentro del gabinete.

El diagrama de la figura muestra una vista del gabinete mencionado. El aire entra al gabinete por medio de un motoventilador y pasa a través de un filtro HEPA al área de trabajo en régimen laminar vertical. El aire desciende hasta la mesa de trabajo de donde sale a un sistema separado de extracción para el tratamiento apropiado. Simultáneamente el aire que entra al gabinete por la reja perforada del frente es inmediatamente llevado al sistema de extracción. Todos los conductos contaminados se encuentran bajo presión negativa.

Gabinetes Clase II – Tipo B3

Según la nueva Clasificación de la NSF (*Nacional Sanitation Foundation*) NSF 49 del 2002 este equipo ha sido substituido por el A2

Uso de los gabinetes de seguridad biológica Clase II

Recordamos que los gabinetes de seguridad biológica Clase II se diseñaron para evitar el escape de patógenos de la zona de trabajo al ambiente del operador, así como para mantener el material y los cultivos libres de la contaminación ambiental. Estos equipos son un elemento importantísimo en la mayoría de los experimentos con material biológico. La salida de patógenos al exterior de la mesa de trabajo es evitada por la cortina de aire que circula por la abertura frontal hacia la reja perforada perimetral de la mesada y por la acción del filtro HEPA de extracción. La cantidad de aire que entra por la reja de entrada es igual a la cantidad de aire extraída a través del filtro HEPA de salida. Por otro lado, la contaminación del área de trabajo se evita por la acción del flujo laminar originado en el filtro de inyección. El aire fluye en régimen laminar hacia la mesa de trabajo y, amén de producir un área limpia, barre los contaminantes generados por la actividad dentro del gabinete. El aire continúa su recirculación por el ventilador hacia el pleno. Los aerosoles se eliminan por los filtros HEPA a medida que el aire retorna hacia la zona de trabajo.

Para utilizar adecuadamente este equipamiento es fundamental el manejo óptimo de los materiales, y minimizar la actividad por una estudiada secuencia de operaciones, procurando eliminar todo movimiento innecesario, para bajar a un mínimo las turbulencias y generación de aerosoles.

Es fundamental evitar obstruir la reja perforada de entrada con cualquier tipo de material.

Certificación

El primer paso al instalarse un equipo de Seguridad Biológica Clase II, consiste en certificarlo, ya sea en cuanto a la integridad del gabinete y su estanqueidad, así como en el ensayo de integridad y la eventual reparación en caso de que hubiera pérdidas de los filtros HEPA. Además debe medirse la uniformidad de flujo de aire.

Preparación de procedimientos: Idealmente deberá hacerse una lista de procedimientos a seguir con una adecuada hoja de ruta, anticipándose los movimientos de materiales, equipos y procesos hasta cumplir con la tarea asignada.

Una vez completada la lista de trabajos se comienza la operación prendiéndose las luces, poniendo en marcha el ventilador, chequeando que las rejas perforadas estén sin obstrucciones y permitiendo el funcionamiento del equipo por unos 15 minutos.

Algunos gabinetes están equipados con lámparas ultravioletas que deben apagarse cuando el personal del laboratorio está ocupando el mismo. La acción bactericida de las lámparas ultravioletas se efectúa cuando el gabinete está fuera de operación, aunque se considera de la mayor importancia la desinfección de las superficies interiores del mismo por lavado de éstas con una solución de alcohol al 70%.

Los operadores deben lavarse cuidadosamente manos y brazos antes y después del trabajo en el gabinete. Se recomienda además que los operadores utilicen guantes de látex con los puños del delantal de mangas largas, ceñidos a las muñecas. No se aconseja el uso de delantales de algodón, sino los de fibra sintética. Lo antedicho baja a un mínimo el peligro de que la flora de la piel contamine el área de trabajo y protege manos y brazos de la contaminación de agentes peligrosos.

Resumiendo, los procedimientos de preparación de los gabinetes de seguridad biológica, tendremos que considerar:

1. Certificación de integridad de los filtros HEPA, balance de la cortina de aire, verificación de la velocidad de desplazamiento del aire y certificación de estanqueidad del gabinete.
2. La preparación de los procedimientos y la hoja de ruta para minimizar los movimientos son fundamentales para una buena disposición de los materiales y productos a ser usados en la experiencia.

3. El procedimiento de puesta en marcha consiste en prender las luces, verificar que las rejas de aire de entrada y extracción no estén obstruidas y la puesta en marcha del ventilador. Deberá permitirse operar al ventilador por un mínimo de 5 minutos antes de dar comienzo a las operaciones dentro del gabinete.
4. Una vez colocados materiales y productos dentro del gabinete sin que ninguno de estos obstruya el paso de aire generando turbulencias sobre los elementos críticos, y disponiéndolos de manera tal que las operaciones planeadas previamente se puedan hacer con comodidad, se dejará el gabinete en funcionamiento por alrededor de 5 minutos para permitir la eliminación de aerosoles que pudieran encontrarse dentro del mismo.
5. Es importante que se disminuyan a un mínimo los movimientos del personal y equipos en las cercanías del gabinete, así como la posibilidad de corrientes de aire provocadas por las puertas y ventanas abiertas. Es recomendable que tanto los equipos Clase II como los equipos de Flujo Laminar común estén dispuestos en zonas del laboratorio lo más alejadas posibles de las puertas de acceso y del movimiento del personal.
6. Todo movimiento es nocivo tanto dentro del gabinete como para la cortina de aire del mismo, por lo que tanto se insiste en el planeamiento adecuado para evitar movimientos innecesarios. Cada vez que brazos o manos se introducen con material al gabinete existe peligro de escape o entrada de aerosoles, lo que se evita con movimientos muy lentos y pausados del operador. La norma 49 de la *National Sanitation Foundation* N.S.F. especifica velocidades de la cortina de aire de 0,5 ms/ seg. (0,55pies/ min) para los equipos A2, B1, B2. Asímismo se recomienda una altura de la apertura por donde se introducen las manos de no más de 20 cm (8”).
7. Finalmente, en la figura 32 se ve una fotografía tomada en los laboratorios de microbiología de The Baker Co., donde se certifica la eficiencia de la cortina de aire de un equipo Clase II. Para ello un tubo de acero introducido en el gabinete simula la acción de un brazo del operador, mientras dos tomadores de muestras biológicas ubicados en el exterior verifican que no haya salida de aerosoles generados en el interior del gabinete. Al mismo tiempo, placas de Petri ubicadas en el interior, verifican la falta de penetración de aerosoles portadores de microorganismos provenientes del exterior.

Figura 32: *Certificación de la cortina de aire.*

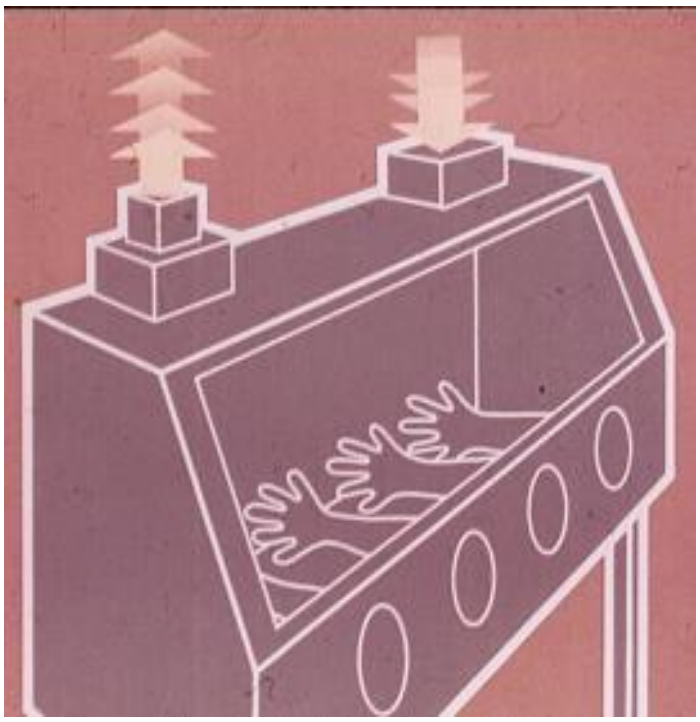
Gabinetes de alta seguridad Clase III

Los gabinetes Clase III, originariamente llamados "cajas de guantes" por sus características constructivas, son gabinetes herméticos en los que el trabajo se efectúa por medio de guantes. Tienen filtros HEPA de inyección y de extracción en régimen turbulento (Figura 33).

El ambiente interior del gabinete se encuentra con una presión negativa con respecto al ambiente exterior de 12,5 mm de columna de agua, para prevenir el escape de aerosoles en caso de que hubiera una fisura accidental.

Se utilizan típicamente para trabajos con cultivos de agentes patógenos de alto riesgo o con virus exóticos, entre ellos: Fiebres Hemorrágicas, Lasa, Ébola y Agentes Infecciosos clasificados como clase 4 por el CDC (Center for Disease Control, Office of Biosafety).

Figura 33: *Gabinete de seguridad Clase III*



Los gabinetes Clase III proveen una barrera física total entre ambientes y operador. Se utilizan actualmente no sólo en la prevención de la contaminación del operador y del ambiente, sino también como aisladores para llenado aséptico de productos farmacéuticos. En este último caso, la presión interior es negativa o positiva dependiendo de si debe mantenerse el ambiente de producción libre de polvo que se procesa o si se aísla una llenadora de líquidos inyectables. La manipulación de los elementos en el interior del gabinete se hace por medio de guantes lo que hace imposible la contaminación por contacto.

Los sistemas Clase III son imprescindibles en el control de contaminantes de alto riesgo y los generados por manipuleo, pesaje y dilución de carcinógenos químicos. También es necesaria su aplicación cuando se trabaja con altas concentraciones de agentes de riesgo moderado o riesgo desconocido.

Los sistemas Clase III cumplen con la máxima seguridad, el doble compromiso de salvaguardar el producto del contaminante exterior, y al exterior del producto, evitándose la contaminación del ambiente de laboratorio y del personal. Un sistema de Clase III puede ser construido para aislar incubadoras, congeladoras centrifugas y otros materiales de investigación.

Autoclaves de doble puerta se conectan a los sistemas para la esterilización de productos, tanto al introducirse o al extraerse del sistema.

Debe ponerse especial cuidado en el control periódico de la integridad de los filtros HEPA y su eventual sellado, así como el control de la hermeticidad de los gabinetes. Es práctica común la utilización en la extracción de dos filtros HEPA en serie, uno en el gabinete y otro en el conducto de extracción.

Como se mencionó anteriormente, los equipos Clase III se están usando en la industria farmacéutica para la aislación de procesos de fraccionamiento o envasado estéril. Se lo utiliza con el nombre de "*Isolators"* (aisladores) en procesos de producción aséptica. Aunque el trabajo por medio de guantes es relativamente incomodo, la mayor ventaja de estos equipos es que se hace prácticamente imposible la contaminación por contacto. Por otro lado, no habiendo introducción de posibles contaminantes, la circulación del aire por filtros HEPA en régimen no laminar es suficiente, manteniéndose la presión positiva en este caso.

Los aisladores usados en el fraccionamiento de una droga peligrosas, como citostáticos, la presión es negativa dentro del gabinete para proteger al personal y al medio ambiente del producto.

Bibliografía.

1. Langmuir. Washington Office Technical Service OSRD Report 865. 1942
2. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* CDC-NIH. US. National Institute of Health. Department of Health and Human Services
3. *Clean Room Design*. W. Whyte
4. NSF National Sanitation Foundation Standard 49
5. *Safe use of Biological safety cabinets or the case of contaminated cultures.* Eagleson Institute Portland Maine
6. IES Institute of Environmental Sciences Standards
7. ISO 14644 Standards
8. National Air Filtration Association (NAFA) Filter guide
9. *El filtrado del aire en la industria farmacéutica.* Mino Covo

Capítulo III.4

Aguas para Aplicaciones Farmacéuticas

Carlos Chiesa

Introducción - Requerimientos generales

Tipos de agua

Control microbiológico

Carbono Orgánico Total (TOC)

Minimización de efluentes

Diseño para el éxito

Aplicaciones futuras. PAT

Especificaciones de la calidad del agua

Métodos de purificación de aguas

Características de los materiales

Sistemas de sanitización y control de la carga microbiológica

Requisitos de los tanques de almacenamiento

Requisitos de los sistemas de distribución

Metodologías para el control de la contaminación microbiológica

Calificación y validación de sistemas de agua. Sistemas nuevos. Sistemas existentes

Documentación para las calificaciones / validaciones

Seguimiento del sistema

Mantenimiento y revisiones del sistema de agua

Bibliografía

Introducción

La elaboración de productos farmacéuticos, como la vida misma, depende del agua. El diseño, operación, mantenimiento, validación y documentación de los sistemas de agua de grado farmacéutico son fundamentales, tanto para mantener las instalaciones de elaboración de medicamentos en niveles adecuados de funcionamiento como para asegurar la calidad del producto final. En definitiva, es tanto un insumo (materia prima) como un servicio.

El agua es la sustancia más ampliamente usada como insumo, en las formulaciones de productos farmacéuticos o procesos generales (lavado principalmente). Debido a su polaridad y puentes de hidrógeno intermoleculares, tiene características químicas que la hacen única. Es capaz de disolver, absorber, adsorber, o suspender muchos

compuestos diferentes. Esto incluye a contaminantes que pueden ser perjudiciales en sí mismos o reaccionar con otras sustancias resultando en riesgo para la salud.

Desafortunadamente, los sistemas mal mantenidos y/o pobremente operados ocupan un lugar preponderante en las listas de problemas enunciados por autoridades regulatorias internacionales tales como EMEA, FDA, TGA, entre otras.

Mantenimiento y operación no quiere decir "configurar, poner en marcha y olvidarse" de las actividades cotidianas. Permanentemente se requieren ajustes en el proceso y el mantenimiento del sistema. "*Dado que el agua es un elemento imprescindible y fundamental, las firmas deben verificar que cuenten con un sistema cuyo diseño es el adecuado a sus necesidades*".

Considerando lo anterior, podemos afirmar que no existe un modelo único para el diseño, operación o mantenimiento que equipare todos los requisitos. Por lo tanto, la elección del sistema correcto para cada una de las necesidades en particular es, desde ya, una tarea compleja.

Los laboratorios deben tener cuidado al confiar demasiado en los equipos diseñados y construidos "en serie" sin transmitir sus necesidades exactas. Debe tenerse en cuenta que un equipo que no ha sido diseñado según los propios requerimientos puede comprometer seriamente la eficiencia del conjunto y requerirá, seguramente, actualizaciones o cambios menores después de la puesta en marcha que pueden perjudicar el sistema en su conjunto. Los equipos estándar tienen sus pros y sus contras. Por lo general el ahorro en los costos no justifica comprometer el servicio y la calidad del agua. El diseño del equipo según las propias necesidades es prácticamente esencial.

Dependiendo de la vía de administración, se requieren diferentes grados de calidad de agua. Estos han sido identificados por las Farmacopeas de diferentes países (FA, USP, BP, entre otras) o internacionales (EP, por ejemplo). En todo momento, la mayor preocupación radica en conservar la calidad del agua en lo que hace a sus atributos fisicoquímicos y/o microbiológicos.

El agua, a diferencia de otros materiales, se toma de un sistema y se utiliza según necesidad. Tampoco está sujeta a ensayos y aprobación antes de su uso, siempre que el sistema se encuentre adecuadamente validado. Por lo anterior, es esencial poder asegurar la calidad del agua, en todos sus atributos, en el momento de ser utilizada. Es bien sabido que algunos análisis microbiológicos requieren tiempos de incubación más o menos largos y los resultados se obtienen tiempo después que el agua ha sido utilizada.

Requerimientos Generales

Es fundamental que los sistemas de agua sean confiables desde todo punto de vista, para que entreguen agua de la calidad requerida en el momento que se necesita. Los sistemas de agua deben cumplir con los principios básicos de las Buenas Prácticas de Manufactura desde su diseño hasta la operación rutinaria. No deben operarse más allá de su capacidad operativa y el agua debe ser producida, almacenada y distribuida de forma de prevenir cualquier tipo de contaminación microbiana, química y/o física (con partículas de polvo, por ejemplo).

Dado que el desempeño de los sistemas de tratamiento de agua depende básicamente de aquella que ingresa al sistema (ya sea del suministro público o tomada de fuentes propias) debe ser monitoreada regularmente para verificar que los parámetros establecidos se mantienen constantes o que se tomen las acciones necesarias en caso de que se excedan los límites. Los registros de los valores encontrados y de las acciones tomadas en cada caso deberán conservarse por tiempos más o menos prolongados según se establezca en los respectivos procedimientos.

Por otro lado, los sistemas de generación, almacenamiento y distribución deben ser controlados en sus atributos de calidad y de funcionalidad para demostrar en todo momento que el agua utilizada en procesos farmacéuticos cumple con los parámetros establecidos.

Además, un sistema de calidad moderno debería evaluar los resultados del seguimiento no solamente por los valores individuales que se van obteniendo sino, y quizás lo más importante, por las tendencias que muestren esos atributos. Una rigurosa evaluación no solamente permitirá mantener al sistema dentro de las especificaciones, sino que permitirá conocer las verdaderas capacidades del mismo en términos de productividad y conservación de sus parámetros.

Tipos de agua

Si bien hay diferentes tipos de agua que se utilizan en los diversos procesos de la industria farmacéutica, básicamente se puede hablar de los que se indican a continuación:

Agua Purificada (PW de *"Purified Water"*),

Agua Altamente Purificada (HPW de *"Highly Purified Water"*) y

Agua para Inyectables (WFI de *"Water for Injections"*).

Las especificaciones y aplicaciones de los diferentes tipos de agua se pueden encontrar en las diversas farmacopeas (FA, BP, EP, USP). Los procesos de purificación consisten, principalmente en reducir la carga de material orgánico (TOC) e inorgánico (conductividad) además de reducir la carga microbiológica y de endotoxinas (en el caso de Agua para Inyectables).

Control microbiológico

La contaminación microbiológica es una gran preocupación en el agua de aplicaciones farmacéuticas. La presencia de microorganismos, incluyendo bacterias y sus endotoxinas es inevitable. Los microbios se encuentran en todos los sistemas de agua, y son impredecibles. Es muy difícil controlar la contaminación dado que un número importante de factores (entre otros, temperatura, pH, velocidad, calidad del medio ambiente, el cuidado en las operaciones) pueden intervenir en la proliferación de microorganismos con la consecuente contaminación del sistema. Puede darse que dos sistemas idénticos tengan comportamientos distintos sólo porque el entorno no es el mismo.

El elemento que se utiliza con mayor frecuencia para controlar el crecimiento bacteriano es el calor. Manteniendo la temperatura del agua por encima de 80 °C se va a lograr la reducción prácticamente total de los microorganismos.

El tratamiento con ozono, que empezó a usarse a principios de 1990, también puede utilizarse, pero su uso no se extendió debido a que las mezclas no resultaron del todo eficientes. Por otro lado, el ozono puede llegar a corroer sellos y juntas si no se maneja cuidadosamente. Se ha comprobado que el ozono contribuye a mantener los sistemas de agua significativamente limpios, por lo tanto puede utilizarse como sanitizante pero debe procederse luego a su eliminación total con luz ultravioleta de 254 nm con verificación de esta remoción antes de utilizar el agua en cualquier proceso productivo.

Las técnicas actualmente más utilizadas para obtener agua para procesos farmacéuticos incluyen la ósmosis inversa (RO), que puede o no estar asociada a la electrodeionización y la destilación. Además, es importante que los tanques sean construidos en Acero Inoxidable 316 L (aleación que incluye cromo / níquel / molibdeno), debido a la inercia que presenta este material frente al calor y a los diferentes productos químicos y/o métodos utilizados en la desinfección.

La mayoría de las bacterias en los sistemas de agua existen formando delgadas películas que se adhieren a las superficies de los equipos, tanques o cañerías. Estas películas se denominan "*biofilms*" (ver capítulo de *Biopelículas* en el presente manual). Estos se pueden encontrar en prácticamente cualquier superficie, donde el medio ambiente proporciona la humedad suficiente.

Dado que es altamente improbable que los contaminantes se distribuyan uniformemente en todo el sistema una muestra tomada en un momento dado puede no ser representativa del nivel real de contaminación en el sistema.

Se puede decir que el "*biofilm*" es prácticamente una amenaza permanente en todos los sistemas. Un vez que se instala, removerlo por completo es algo realmente muy difícil. Por lo tanto se debe trabajar desde el diseño en la prevención de la acumulación de bacterias para que no se formen esas películas, que luego aparecen y reaparecen a pesar de las sanitizaciones. El punto clave, pero de difícil logro, es prevenir la acumulación de bacterias con lo que se podrá controlar la formación de las biopelículas.

En general los sistemas que no toleran la desinfección por calor son los más propensos a la formación de "*biofilms*" que traen como consecuencia la aparición en forma aleatoria de microorganismos.

La eliminación incompleta de esta película de origen bacteriano solamente conducirá a que ésta vuelva a desarrollarse nuevamente. Para destruir este desagradable habitante de los sistemas de agua se utilizan

tratamientos químicos tales como el ozono, el cloro, el dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ácido peracético y el hidróxido de sodio. Sin embargo, todo lo que se agregue al sistema luego debe ser retirado y, de una forma u otra debe quedar evidencia de esta remoción.

Los tratamientos físicos de sanitización incluyen la recirculación de agua caliente (80 °C o más) durante tiempos establecidos, limpieza mecánica por raspado y sistemas de rociado de agua a alta presión.

Los sistemas de agua a temperatura ambiente requieren que todos sus componentes sean sanitizados. Si bien estos procesos son más importantes en la medida que nos acercamos al final del sistema, no hay que olvidarse del comienzo del mismo, que suele ser en la mayoría de los casos la fuente del problema a mediano o largo plazo.

No existe una prohibición formal respecto del uso de filtros (de profundidad o de membrana), sin embargo estos elementos no son aceptados como el único sistema para la "limpieza" microbiológica del agua. Es importante señalar que los filtros constituyen una "barrera" que retiene los microorganismos. Si se produjera una falla o un inadecuado manejo todo el volumen acumulado podría volcarse al agua generando altos niveles de contaminación. Desde la superficie de los filtros pueden recolectarse fácilmente los microrganismos dado que son su propia fuente de nutrición, su crecimiento se acelera, mientras que el filtro les proporciona el soporte para que puedan sobrevivir.

Carbono orgánico total (*Total Organic Carbon* - TOC)

La medición de TOC es un requerimiento de varias farmacopeas (USP, EP, entre otras) para evaluar uno de los atributos de calidad del agua utilizada en la elaboración de los productos farmacéuticos. Esta determinación es una medida indirecta de las moléculas orgánicas presentes el agua, expresada en carbono.

Se ha establecido que los orígenes probables de estas moléculas sean: desde la fuente misma, las diferentes etapas de purificación, los materiales del sistema de distribución y/o de los "*biofilms*" que pueden crecer en el sistema.

La determinación del TOC puede hacerse "en línea" (con equipos que miden directamente el agua que está circulando por el sistema) o "fuera de línea" (tomando la muestra y realizando el análisis en el laboratorio).

Si la toma de las muestras se realiza adecuadamente (previniendo cualquier contaminación) el método fuera de línea puede ser más preciso. De cualquier manera no es un método instantáneo. Por otro lado, los métodos "en línea" tienen el mérito de brindar información en forma de monitoreo constante, siempre y cuando no haya interferencias químicas o errores en las lecturas de los instrumentos que pongan en peligro los beneficios de este análisis.

Minimización de efluentes

Aunque algunas empresas tratan de reintroducir el agua de rechazo que genera la ósmosis reversa, esto puede no llegar a lograrse por razones económicas. Otras empresas están utilizando el agua de rechazo, luego de ponerla en condiciones, para regadío, torres de enfriamiento, calderas o sanitarios.

La mayoría de estos sistemas se instalan y ponen en marcha a partir de una sana preocupación por el medio ambiente y un buen comportamiento.

Si hay un real interés por ahorrar agua, lo que debe hacerse es auditar el consumo de agua. Se podrán encontrar, fácilmente, áreas donde hay abuso del consumo de agua (lavaderos) o se podrá observar que el sello de una bomba sanitaria tiene una fuga, lo que ocasiona la pérdida de cientos de litros por día.

Diseño para el Éxito

El diseño de un nuevo sistema de agua farmacéutica no es un trabajo para gente sin experiencia. Hay muchos matices en estos sistemas. Las necesidades actuales de la planta y las necesidades futuras deben ser tomadas en consideración. Aún los diseños de plantas que incluyan una mayor capacidad que la necesaria puede resultar en problemas.

Las plantas que son sobrediseñadas tienden a tener largos períodos entre regeneraciones, lavados u otros eventos de mantenimiento regular, lo que permite más posibilidades para el desarrollo de "*biofilms*".

El grupo involucrado en el diseño de la planta o en eventuales mejoras debe conocer realmente los requerimientos de la planta. Una etapa fundamental en el diseño de un sistema de agua consiste encontrar las respuestas a estas preguntas:

¿Cuánta agua se usa?
¿Qué tolerancias son necesarias para el equipo?
¿Qué datos deben ser recogidos?

Si no es posible encontrar las respuestas, el grupo de diseño debe proponer lo que considere adecuado y esta propuesta debe ser aprobada antes de comenzar el diseño en concreto.

No menos importante es determinar la calidad del agua que llega a la planta. Esto debe hacerse en forma estricta y en diferentes condiciones estacionales, sobre todo si se toma agua de fuentes propias sin tratamientos previos de potabilización. Deben realizarse importantes estudios de los atributos de agua "fuente" antes de comenzar el diseño de las plantas. Realmente no se conoce, a ciencia cierta, el agua que se tiene hasta que se hagan los análisis pertinentes. Por otro lado, desarrollar sistemas capaces de tratar aguas de muy disímiles características puede resultar excesivamente caro.

Aplicaciones Futuras (*Process Analytical Technologies*)

Las herramientas que se utilizan actualmente para evaluar los atributos del agua no son estrictamente Tecnologías Analíticas aplicadas a Procesos (PAT) dado que los instrumentos en línea que permiten medir TOC y conductividad no están asociados a ninguna medida de control de procesos específicos, sino que se utilizan para el monitoreo y evaluación de la calidad del agua. Esto está más en línea con la denominada Liberación en Tiempo Real (*Real Time Release* – RTR) que con lo identificado como PAT.

A la fecha no existe un instrumento que evalúe el contenido microbiológico que pueda ser utilizado para RTR, el tercer elemento de la calidad del agua farmacéutica. Un dispositivo en línea que pueda medir los microorganismos es probable que cambie la industria. Este dispositivo también podría ser utilizado como base para una aplicación de PAT / RTR.

Especificaciones de la calidad del agua

Los requerimientos que se detallan a continuación están referidos al agua procesada, almacenada y distribuida en la forma "a granel". Es decir, no es agua envasada en contenedores (ampollas, viales, frascos, entre otros) y no cubren los requerimientos del agua administrada a pacientes.

Agua potable

Esta debe ser suministrada bajo presión positiva continua por medio de un sistema de cañerías libre de cualquier defecto que pudiera conducir a la contaminación de cualquier producto. El agua potable se obtiene mediante el tratamiento de la que se toma de fuentes naturales o de reservorios. Las fuentes del agua natural pueden diferir y esto define el tipo de tratamiento que se le debe hacer para convertirla en apta para el consumo humano (potabilización). También es común encontrar que el agua provenga de un sistema de suministro público, que puede ser una combinación de aguas de distintas fuentes. Las empresas públicas de provisión de agua tienen la obligación de garantizar que el agua potable que entregan es de calidad "potable".

Si el agua potable es utilizada para algún tipo de proceso (directo o de apoyo), la calidad de esta agua debe ser evaluada periódicamente para verificar que sus atributos permanecen dentro de los parámetros establecidos por las autoridades nacionales e internacionales.

Agua Purificada.

Debe ser obtenida a partir de Agua Potable como el requerimiento mínimo de calidad del agua que alimente al sistema. Debe cumplir, además, con las especificaciones de las diferentes farmacopeas en lo que hace tanto a la calidad química como microbiológica. También debe ser preservada de eventuales recontaminaciones y/o proliferación microbiológica.

Agua Altamente Purificada

Debe ser obtenida a partir de Agua Potable como el requerimiento mínimo de calidad del agua que alimente al sistema. Esta especificación de calidad de agua se encuentra en la Farmacopea Europea (EP) donde se indica que debe cumplir con los mismos atributos de calidad que el **Agua para Inyectables** incluyendo el límite para endotoxinas, pero que los sistemas de tratamiento a utilizar pueden ser diferentes a la destilación. El **Agua Altamente Purificada** puede ser obtenida por diversos métodos tales como ósmosis reversa, ultrafiltración y deionización.

Agua para Inyectables

Debe ser obtenida a partir de Agua Purificada como el requerimiento mínimo de calidad del agua que alimente al sistema. El Agua para Inyectables no es agua estéril y no se encuentra envasada en su contenedor final. Es un producto intermedio a granel. El Agua para Inyectables es la calidad más alta dentro de las aguas de uso farmacéutico.

Es importante destacar que algunas farmacopeas aplican ciertas restricciones al método de elaboración del Agua para Inyectables. Por ejemplo, la Farmacopea Internacional y la Farmacopea Europea sólo admiten que se utilice el método de destilación como etapa final de purificación en la obtención de este tipo de agua.

Métodos de Purificación de Aguas

Consideraciones Generales

Excepto en el caso del **Agua para Inyectables** donde la Farmacopea Internacional y la Europea requieren que se obtenga por destilación no hay indicaciones respecto del método a utilizar para obtener agua para procesos farmacéuticos. El método, o la secuencia de pasos, a seguir en la purificación del agua depende, básicamente, de la fuente de agua y de su aplicación.

Para seleccionar el método de purificación debemos considerar los elementos que se indican a continuación:

- La especificación de calidad del agua
- El rendimiento o eficiencia del sistema de purificación
- El origen del agua (su fuente) y eventuales cambios estacionales.
- La confiabilidad y robustez del equipo de tratamiento de agua durante su operación
- La disponibilidad de los equipos de tratamiento de agua en el mercado
- La capacidad de sostener y mantener adecuadamente el equipo de purificación
- Los costos de operación.

Por otro lado, las especificaciones de los equipos de purificación, almacenamiento y distribución deberían considerar lo siguiente:

- El riesgo de contaminación debido a los materiales que puedan ceder esos equipos al agua.
- El impacto adverso que pueda producir la absortividad de los materiales en contacto con el agua.
- Diseño sanitario (según corresponda)
- Equipos libres de fugas
- Configuración que evite la proliferación de microorganismos.
- Tolerancia a agentes de limpieza y sanitización (físicos o químicos)
- La capacidad del sistema y los requerimientos de producción
- La provisión de todos los instrumentos necesarios y puntos de muestreo para permitir el seguimiento a lo largo de todo el sistema de los parámetros de calidad críticos.

El diseño, la configuración y la distribución de los equipos de purificación, almacenamiento y distribución debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- El espacio necesario para su instalación
- La carga estructural en los edificios
- La provisión de espacio adecuado para el mantenimiento y operación
- La posibilidad de un manejo seguro de los productos químicos usados en la regeneración y sanitización.

Producción de Agua Potable

Los procesos típicos empleados en una planta propia o por suministro público incluyen:

- Filtración
- Ablandamiento;
- Desinfección o sanitización (por ejemplo, agregando hipoclorito de sodio (cloro)
- Eliminación de Hierro (ión ferroso)
- Precipitación
- Reducción de materiales inorgánicos específicos / orgánicos.

Si la calidad del agua potable cambia de manera significativa, los sistemas de tratamiento aguas abajo deben revisarse y los resultados de la evaluación deben documentarse.

El almacenamiento y los sistemas de distribución no deben permitir que el agua degrade su calidad antes de ser usada. En cualquier sistema de almacenamiento los análisis deben llevarse a cabo de forma rutinaria siguiendo un método definido.

Los equipos y sistemas utilizados para producir agua potable deben ser capaces de ser drenados y sanitizados. Los tanques de almacenamiento deben estar cerrados con sistemas de ventilación debidamente protegidas, permitiendo la inspección visual.

Especial cuidado se debe tomar para controlar la contaminación microbiológica de filtros de arena, lechos de carbón y ablandadores de agua. Una vez que los microorganismos han contaminado un sistema, rápidamente pueden formar "*biofilms*" que se pueden extender a todo el sistema.

Producción de Agua Purificada

Al configurar un sistema para obtener Agua Purificada se debe considerar lo siguiente:

- La calidad de agua de alimentación y su variación estacional;
- La especificación de la calidad del agua;
- La secuencia necesaria de etapas de purificación;
- El consumo de energía;
- El tratamiento previo necesario para proteger la purificación final;
- Optimización del desempeño, incluyendo el rendimiento y la eficiencia de la unidad de tratamiento
- Los pasos del proceso;
- Ubicación adecuada de los puntos de muestreo diseñados de tal manera que se puedan hacer evaluaciones certeras en caso de contaminaciones;
- La unidad de proceso debe contar con instrumentos adecuados para medir parámetros tales como flujo, presión, temperatura, conductividad, pH y el carbono orgánico total (TOC);
- La temperatura ambiente. Los sistemas de Agua Purificada son especialmente susceptibles a contaminación microbiológica, sobre todo cuando el equipo no funciona durante períodos de baja o nula demanda de agua.
- Es esencial considerar los mecanismos para el control microbiológico y sanitización. Por ello se deben tener en cuenta los elementos que se indican a continuación:
  - El mantenimiento del flujo de agua a través de los equipos de purificación y en los sistemas de almacenamiento y distribución en todo momento.
  - Control de la temperatura en el sistema mediante intercambiadores de calor o enfriamiento del local donde se instala el equipo para reducir el riesgo de crecimiento microbiano;

- Distribución con filtros de luz ultravioleta;
- Selección de los componentes del sistema de tratamiento de agua que pueden ser térmicamente sanitizados y/o aplicación de sanitizantes químicos.

Producción de Agua Altamente Purificada

Cualquier técnica puede ser usada para obtener Agua Altamente Purificada. Típicamente se aplican intercambio iónico, ultrafiltración u ósmosis reversa.

Producción de Agua para Inyectables

La destilación es la técnica de elección, se considera una técnica más sólida considerando el cambio de estado, y en algunos casos, la operación a altas temperaturas en los equipos. Al diseñar un sistema para obtener Agua para Inyectables, lo siguiente debe tenerse en cuenta:

- La calidad de agua de alimentación;
- La calidad y cantidad de agua necesaria;
- La capacidad del generador, que debe ser muy bien definida para evitar frecuencias altas del ciclo arranque-parada.
- Características de las purgas y las funciones de descarga,
- Las ventilaciones, para que al enfriarse el equipo se evite la entrada de eventuales contaminantes.

Sistemas de purificación, almacenamiento y distribución de agua de uso farmacéutico

Es muy importante recordar que en los sistemas de agua de uso farmacéutico (AUF) las etapas de almacenamiento y distribución deben trabajar en conjunto con la planta de purificación para asegurar la entrega constante de agua en todos los puntos de uso cumpliendo con las especificaciones establecidas. Es necesario recalcar que el sistema de almacenamiento y distribución debe ser considerado como una parte clave del sistema en su totalidad y debe diseñarse completamente integrado con los componentes del sistema de purificación del agua.

Luego de haber purificado el agua por alguno de los métodos aceptados ésta puede ser usada directamente o, lo que es más común, ser dirigida a un recipiente para su posterior distribución a los diferentes puntos de uso. El sistema de almacenamiento y distribución debe ser diseñado de tal manera que prevenga, en todo lo posible, la contaminación del agua luego de ser tratada. Por lo tanto debe prevenirse este riesgo mediante el monitoreo constante de los atributos de calidad del agua.

Características de los Materiales

Esta sección está dedicada a describir las características que deben tener aquellos materiales de los diferentes componentes del sistema que están en contacto con el agua. Los materiales de elementos tales como cañerías, válvulas, accesorios, sellos, diafragmas e instrumentos deben seleccionarse de forma que alcancen los siguientes objetivos:

- *Compatibilidad.* Todos los materiales que se utilicen en el sistema deben ser compatibles con el mismo considerando las temperaturas de trabajo y los productos químicos que puedan llegar a usarse.
- *Prevenir la liberación de componentes solubles* por parte de los materiales que entran en contacto con el agua en el ámbito de las temperaturas de trabajo.
- *Resistencia a la corrosión.* Las diferentes aguas de uso farmacéutico presentan un alto nivel de corrosividad. Para prevenir fallas en el sistema con su consecuente contaminación, los materiales deben soportar la corrosión, los métodos de unión deben ser cuidadosamente controlados y todos los accesorios y demás componentes deben ser compatibles con las cañerías utilizadas. Algunos plásticos que han sido aceptados

(PVDF, por ejemplo) y el acero inoxidable (tipo 316 L o superior) son materiales típicos para estos sistemas. Para mantener la resistencia a la corrosión, es necesario que luego de completar una instalación o si se hace algún trabajo en las de acero inoxidable, se proceda a su pasivación antes de ponerla en uso.

- *Terminaciones interiores suaves.* Una vez que el agua ha sido purificada es susceptible de contaminación microbiológica quedando el sistema sujeto a la posible formación de *biofilms* cuando se utilizan sistemas que trabajan a temperatura ambiente. La utilización de superficies interiores suaves conduce a evitar rugosidades y hendiduras o grietas dentro del sistema de aguas de uso farmacéutico. Precisamente es en las hendiduras donde la corrosión usualmente comienza. La terminación de las superficies interiores deberían tener un promedio de rugosidad (Ra) de 0,8 a 1,0 micrones. Se debe señalar que definiciones tales como pulido tipo "espejo" o "sanitario" no representan calidad alguna. La rugosidad debe medirse y deben alcanzarse los valores antes mencionados. Cuando se utiliza acero inoxidable, deben aplicarse técnicas de pulido mecánico o electropulido. Esta última metodología, por lograr superficies más suaves, mejora la resistencia del acero a la corrosión superficial.
- *Soldaduras.* Los materiales de los sistemas seleccionados deben permitir su fácil colocación mediante procedimientos de soldadura debidamente controlados. Los controles de las soldaduras comienzan con la calificación de los soldadores así como todos los elementos, materiales y equipos que se utilizan, y la documentación que respalde los trabajos realizados, además de muestras típicas de las soldaduras (probetas), registro de las soldaduras con planos de identificación y criterios de inspección visual o instrumental de acuerdo a estándares.
- *Diseño de las juntas o uniones.* Las juntas que se utilicen deben ser de diseño sanitario o higiénico (sin hendiduras ni superficies irregulares). Debe verificarse que se utilizan sellos de materiales apropiados para cada sistema en particular para lograr que estas juntas sellen adecuadamente y queden firmemente ajustadas.
- *Documentación.* Todos los componentes del sistema deben estar completamente documentados y deben estar soportados por certificados originales de cada uno de los materiales.

Sistemas de sanitización y control de la carga biológica

Los sistemas de tratamiento del agua, almacenamiento y distribución usados para la industria farmacéutica deben poseer características que les permitan controlar la proliferación de microrganismos durante la operación normal así como técnicas para la sanitización o esterilización del sistema luego de intervenciones por mantenimiento o modificaciones. Las técnicas de sanitización deben haber sido consideradas en el diseño del sistema y verificadas durante las etapas de puesta en marcha y validaciones posteriores.

Es sabido que los sistemas que operan a temperaturas en el rango de 70 a 80 °C son generalmente menos susceptibles de contaminación microbiológica que aquellos que trabajan a temperaturas menores. Si el proceso de obtención del agua o sus aplicaciones posteriores requieren que se utilicen temperaturas menores que 70 – 80 °C, deben tenerse especiales precauciones para prevenir el ingreso y proliferación de microorganismos.

Requisitos de los Tanques de Almacenamiento

Los tanques de almacenamiento en los sistemas de agua deben alcanzar una serie de importantes objetivos. Para su diseño así como su dimensionamiento deben considerarse los siguientes factores:

- *Capacidad*. Debe determinarse a partir de los siguientes requisitos:
    - Es necesario considerar una capacidad de amortiguación entre la generación de agua y su consumo en los diferentes puntos de uso. El tanque es el reservorio por naturaleza del sistema.
    - Para prevenir ineficiencias y problemas por el apagado y encendido de los equipos de generación de agua, el tanque debe estar incluido en un subsistema de circulación de agua para permitir el funcionamiento continuo de los equipos generadores.
    - La capacidad debe ser suficiente para funcionar como reserva en caso de fallas del equipo de generación, o si éste se encuentra en ciclos de sanitización o mantenimiento.

- Para definir el tamaño del tanque no sólo se deben considerar los consumos debidos a la elaboración de lotes de producto farmacéutico, sino también a aquellos consumos debidos a operaciones de lavado, esterilización, limpieza en general y demás aplicaciones que requieran agua calidad farmacéutica.
- Para determinar el tamaño de la reserva se debe proporcionar cantidad suficiente de agua para poder completar la formulación de algún lote, una sesión de trabajo, ciclos de funcionamiento de máquinas lavadoras, autoclaves y de cualquier otro equipo que consuma agua del tanque.

- *Control de Contaminación.* Para poder prevenir riesgos de contaminación debe tenerse en cuenta lo que se detalla:
  - El volumen entre la superficie del agua y la tapa del tanque ("espacio cabeza" o "*head space*") es un área de riesgo donde el agua, que se encuentra en forma de gotas entra en contacto con el aire a temperaturas que suelen fomentar la proliferación de microrganismos. Por lo tanto el diseño del tanque y del lazo de circulación debe ser configurado de forma tal que el "espacio cabeza" se encuentre todo el tiempo "mojado" por el flujo de agua. Es importante entonces, incluir las esferas de rociado o *"spray balls"* que deben tener una distribución de sus aberturas tal que permita que las paredes del tanque efectivamente se mojen con el agua que ingresa al tanque.
  - Si se colocan puntos de muestreo en los tanques deben diseñarse de forma tal que no generen zonas muertas donde la contaminación puede albergarse. En todo momento debe haber circulación de agua.
  - Los filtros de venteo se colocan en los tanques para permitir la fluctuación del nivel de agua dentro del tanque. Es importante que estos filtros se mantengan secos para disminuir los riesgos de proliferación microbiana. Para ello deben ser calefaccionados.
  - Otro elemento que se coloca en los tanques es el filtro de ruptura, que se instala para protegerlos de una sobre-presurización. Estos deben ser de diseño sanitario y deben estar adecuadamente protegidos para evitar que una rotura externa (y no debida a sobrepresión) provoque una alteración en la integridad del sistema.

Requisitos de los Sistemas de Distribución

Los sistemas modernos de distribución de Agua Purificada (PW), Agua Altamente Purificada (HPW) y Agua para Inyectables (WFI) requieren que se utilicen sistemas de distribución en lazo cerrado. En estos sistemas debe controlarse la proliferación bacteriana. No se deben instalar filtros en los lazos de distribución o en los puntos de inicio del lazo, ya que éstos podrían ocultar contaminaciones del sistema.

- ***Agua a temperatura controlada e Intercambiadores de Calor.*** Cuando se utilizan Intercambiadores de Calor (IC) para calentar o enfriar dentro de un sistema de agua de uso farmacéutico se deben tomar precauciones para que este procedimiento no permita la contaminación del agua. En todos los casos deben utilizarse tipos de IC aprobados por las autoridades sanitarias (FDA, por ejemplo). Es muy importante evitar en todo momento que el agua de uso farmacéutico quede estancada en el equipo. El IC debe ser parte del lazo por donde circula el agua. Normalmente es necesario reducir la temperatura del agua para poder ser utilizada en los diferentes procesos. Estos descensos de temperaturas deben ser lo más cortos posible. Finalmente, los tiempos de los ciclos de enfriamiento deben ser probados adecuadamente durante la calificación del sistema.
- ***Bombas impulsoras.*** Son las que mueven el agua dentro del lazo de distribución. Éstas deben tener un diseño sanitario (rugosidad de sus cabezales especificada y verificada) con sellos apropiados, de forma tal que impidan la contaminación del sistema. Si se poseen bombas en *"stand by"* estas pueden quedar fuera del lazo (secas) o configuradas dentro del lazo, evitando que queden zonas muertas o agua atrapada dentro del sistema.
- ***Metodologías para el control de la contaminación microbiológica.*** Las más comúnmente usadas son:
  - Mantenimiento de la circulación continua del agua bajo un régimen de flujo turbulento. Esto reduce la propensión a la formación de *biofilms.* Uno de los puntos importantes a verificar en la validación del sistema de agua es, precisamente, que se haya mantenido en el sistema en funcionamiento la velocidad

originalmente diseñada. Fluctuaciones en la velocidad de flujo pueden causar problemas de contaminación.

- El diseño debe considerar reducir al mínimo la extensión de las cañerías.
- Para sistemas de agua que trabajan a temperatura ambiente, estos deben estar aislados de fuentes de calor.
- Debe evitarse la construcción de "patas muertas" en los sistemas de distribución cuya longitud exceda 1,5 veces el diámetro de la rama lateral.
- Los manómetros deben ser de tipo "membrana".
- Las válvulas deben ser de tipo "a diafragma".
- Las cañerías deben instalarse considerando su pendiente y caída hacia los puntos de drenaje.
- Por otro lado, el crecimiento de microrganismos puede ser inhibido por:
  - Lámparas de irradiación de luz ultravioleta intercaladas en el sistema
  - Manteniendo el sistema calefaccionado (entre 70 y 80 °C)
  - Sanitizando los sistemas de temperatura ambiente sobrecalentado con agua caliente por encima de los 70 °C, agua sobrecalentada o vapor limpio.
  - Medio de desinfecciones químicas con Ozono u otros agentes químicos. En estos casos es esencial demostrar que el agente ha sido removido antes de utilizar el agua para procesos productivos u otras aplicaciones que podrían afectar al producto (lavado, por ejemplo).

Calificación y Validación de Sistemas de Agua

Dada la importancia que tiene el agua en la industria, no podemos dejar de considerar los sistemas de agua, cualquiera sea, como críticos. Precisamente por esta característica se deben calificar y validar los sistemas de generación, almacenamiento y distribución del agua que se utiliza.

Es importante señalar que no es lo mismo validar un sistema nuevo que uno existente.

Calificaciones y Validaciones para Sistemas Nuevos:

Se considera a un sistema como nuevo a aquel que se instala por primera vez en un edificio (nuevo o existente), o aquellos sistemas existentes que sufren alguna modificación. En este último caso los criterios de calificación y validación aplicarán al conjunto de elementos que se modifican respecto del sistema existente. Finalmente, en estos casos, el equipo de validaciones de cada empresa decidirá el alcance de los trabajos a realizar.

En cualquiera de los casos mencionados en el párrafo anterior, las tareas de calificación y validación comienzan en el momento que la empresa decide construir o modificar un sistema de agua. Es en ese preciso momento, donde deben armarse los grupos de trabajo para llevar a cabo no solamente la documentación de ingeniería sino aquella correspondiente a calificaciones y validaciones.

El primer documento a desarrollar es el denominado **Requerimiento de Usuario,** que no deberá incluir solamente las necesidades técnicas, analíticas o productivas, sino que deberá contemplar todos los aspectos del sistema que se vaya a instalar, según se detalla a continuación con algunos ejemplos:

- *Requerimientos generales* (calidad, volúmenes, utilización)
- *Requerimientos de la instalación* (en un nivel o en varios)
- *Requerimientos de equipos principales* (osmosis reversa, electrodeionización, destiladores, intercambiadores de calor, entre otros)
- *Requerimientos de los sistemas asociados* (controles, alarmas, comunicaciones)
- *Requerimientos de los servicios* (aire acondicionado, vapor, aire comprimido, gases inertes)

- *Requerimientos de instrumentos a instalar* (calibrables, aptos para su aplicación)
- *Requerimientos de limpieza, sanitización y distribución* (metodología, aplicación. frecuencias)
- *Requerimientos de documentación* (planos isométricos, de arquitectura, de instrumentación y cañerías – P&ID, calificaciones de los proveedores)
- *Requerimientos de sistemas informáticos*. (PLC´s de control, lógica del sistema, comunicaciones, registro de variables y alarmas. Seguridad de los datos y del manejo
- *Requerimientos de mantenimiento.* (listado de repuestos críticos, frecuencias y tipos de mantenimiento, capacitación del personal)
- *Requerimientos para los proveedores* (auditorías y calificaciones de los proveedores, antecedentes, calificaciones del personal de los instaladores, capacidad económica)
- *Requerimientos en seguridad y protección ambiental* (manejo de efluentes, manejo de equipos, niveles de iluminación y de ruidos, contención de derrames)
- *Requerimientos relacionados con el personal* (de todos los sectores que participan: capacitaciones, calificaciones, disponibilidad, nivel educacional)
- *Requerimientos regulatorios / normativas de aplicación* (normas a cumplir, nacionales, regionales o internacionales)

Fácilmente, podemos ver que si se desarrolla un **Requerimiento de Usuario** amplio y con la participación de todos los sectores involucrados, el sistema se habrá pensado acabadamente y se habrán minimizando de esta forma las "sorpresas", mayores costos y problemas de calidad o provisión.

Inmediatamente de concluido el Requerimiento de Usuario y mientras se diseña el sistema de agua se deberá desarrollar el **Plan Maestro de Validación (PMV)** del Sistema de Agua.

Este documento resume la manera de encarar en forma general la validación del sistema de agua y expresa las ideas y los criterios utilizados para definir un desempeño adecuado. Todas las actividades relacionadas al sistema de agua deben ser incluidas en el PMV.

El PMV debe tener un formato y contenido establecidos por procedimientos, pero a su vez debe ser breve, conciso y claro. Pero por sobre todas las cosas no debe repetir información ya establecida en otros documentos. Toda vez que corresponda, deberá referirse a otros documentos tales como Políticas, Procedimientos, Informes u otra documentación pre-existente. Es un documento que debe ser preparado y consensuado por todos los sectores intervinientes en el proyecto.

El contenido mínimo de un PMV, para un sistema de agua, se indica a continuación:

1. Descripción general del sistema
2. Alcance del PMV y del sistema a calificar
3. Ubicación
4. Cronograma de tareas (incluyendo prioridades).
5. Responsabilidades del personal interviniente (claramente definidas)
6. Referencias a otros documentos (normas, farmacopeas, procedimientos).
7. Consideraciones específicas del sistema a validar (sistema de agua y complementarios)
8. Lista de elementos (o subsistemas) a ser calificados con indicación del nivel de calificación (ejemplo, DQ; IQ; OQ y/o PQ).
9. Atributos generales a considerar en cada etapa de las calificaciones y sus criterios de aceptación.
10. Formato de la documentación (requerida por procedimientos)
11. Control de Cambio (referencia a este documento) para su aplicación irrestricta.

Luego de redactado el PMV y, en la medida que se van completando las diferentes fases del proyecto (diseño, instalación, puesta en marcha, desempeño) se deben redactar los diferentes tipos de protocolos para calificar cada una de las etapas. Los protocolos, clásicamente establecidos, son:

1. ***Calificación de Diseño (DQ):*** En esta calificación se verifica que el proyecto a construir e instalar cumple con el Requerimiento de Usuario (RU) para ello se desarrollan protocolos donde se controla punto a punto cada una de las especificaciones establecidas en el RU. En caso de haber diferencias, se deberán tomar las acciones pertinentes para demostrar que éstas no van en detrimento de aquello que fue requerido. Solamente luego de haber aprobado la Calificación de Diseño y de haber resuelto las diferencias (si las hubo) se podrá comenzar con la construcción de los diferentes componentes del sistema y con su instalación.

2. ***Calificación de Instalación (IQ):*** Luego de completada la instalación y antes de la puesta en marcha de cada uno de los componentes, se debe verificar que lo instalado cumple con lo aprobado en la Calificación de Diseño. La Calificación de Instalación debe presentar un alto nivel de detalle, para que ello sea posible se debe requerir la información pertinente a los proveedores para luego controlar contra lo instalado. Sin esta información es prácticamente imposible desarrollar una Calificación de Instalación moderna que cumpla con altos estándares de calidad. Luego de completar satisfactoriamente la Calificación de Instalación se puede poner en marcha cada uno de los componentes del sistema para verificar su operación.

3. ***Calificación de Operación (OQ)***: Una vez que se ha resuelto la Calificación de Instalación y que ésta ha alcanzado los criterios de aceptación previamente establecidos, se puede poner en marcha el sistema (mediante cada uno de los elementos que lo componen). Luego de poner en funcionamiento el sistema se deberá llevar a cabo la Calificación de Operación. En esta fase de la calificación se verificará que todos los elementos funcionan según lo establecido. Se deberán hacer pruebas de alarmas, los sistemas automáticos manejados por PLC deberán ser desafiados y sus respuestas serán registradas. En esta fase de la calificación se deberá controlar el adecuado funcionamiento de todos los elementos que hacen al sistema (desde el ingreso del agua de provisión, equipos de pretratamiento, equipo de tratamiento y sistemas de almacenamiento y distribución). Al concluir esta calificación, los procedimientos relacionados con la operación, mantenimiento y control del sistema deben haber sido aprobados y puestos efectivamente en uso. Luego de comprobar que todos y cada uno de los elementos que componen el sistema operan adecuadamente y que los procedimientos han sido efectivamente implementados, se puede dar por aprobado la Calificación de Operación y se puede seguir al próximo paso de la validación que es la Calificación de Desempeño (PQ).

4. ***Calificación de Desempeño (PQ).*** Es la última etapa de la validación del sistema y consiste en tomar muestras de los diferentes puntos y con diversas frecuencias para demostrar que se alcanzan las especificaciones de calidad pretendidas. Clásicamente esta calificación se divide en tres fases y se prolonga por, al menos, un año para evaluar el comportamiento del agua debido a variaciones estacionales. Es importante destacar que no es necesario esperar un año para utilizar el agua en procesos.

La fase 1 comprende no menos de 15 días y el muestreo es diario en lo posible en todos los puntos de muestreo y uso. En esta fase el agua no puede ser utilizada. Una vez obtenidos todos los resultados de esta fase, y en caso de ser satisfactorios, el agua puede ser utilizada.

La fase 2 comprende un período similar con muestreo equivalente a la fase 1.

La fase 3 dura un año, y el plan de muestreo puede ser disminuido asegurando que el sistema sigue igual bajo control.

Con respecto a las distintas fases de la Calificación de Desempeño se pueden encontrar importantes referencias en los documentos de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los EEUU y de la Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO *Technical Report* 929, Anexo 3)

Seguimiento del Sistema.

Luego de completar la fase 3 del programa de calificación de desempeño debe efectuarse una revisión e informe. A partir de este documento debe establecerse una rutina de seguimiento basada en los resultados de la fase 3.

Este seguimiento es una combinación de la información que entregan los instrumentos instalados en línea, (flujo, presión, temperatura, conductividad y carbono orgánico total) con aquella obtenida a partir de las muestras tomadas para evaluar la calidad microbiológica.

Las muestras deben ser tomadas de puntos de uso y/o de muestreo específicamente definidos a partir de los resultados de la calificación de desempeño. Las muestras de los puntos de uso deben ser tomadas de la misma forma en que el agua es utilizada para los diferentes procesos.

Con la frecuencia que se establezca deben realizarse análisis complementarios tales como pH, metales pesados, nitratos entre otras determinaciones.

Este seguimiento debe hacerse aplicando análisis de tendencia.

Calificaciones y Validaciones para Sistemas Existentes

Sistemas existentes son aquellos instalados en las plantas y que no han sido modificados en los últimos años. En este caso y si no se tomaron todas las previsiones más arriba mencionadas, se hace muy difícil reunir la información básica necesaria para que la calificación sea lo suficientemente completa y robusta para poder afirmar que el sistema está "validado".

Sin embargo, y considerando las aplicaciones del agua, algo hay que hacer. Seguidamente se indican los documentos mínimos que se deberían reunir (si existen) o preparar (en caso de no tenerlos) para lograr un conocimiento lo más detallado posible del sistema de agua.

Estos son:

1) Listado de los puntos de uso con sus identificaciones.

2) Planos del sistema en su conjunto (desde el ingreso del agua de suministro o fuente) con indicación clara de los puntos de uso y/o muestreo. Este plano debe mostrar la instalación real en el edificio.

3) Planos isométricos que indiquen los materiales utilizados, las pendientes del sistema de distribución, los puntos de drenaje y los equipos instalados en el sistema con el mayor grado de detalle posible.

4) Si el sistema tiene algún grado de automatismo es necesario un plano (o esquema) que muestre las vinculaciones entre los puntos de control y los elementos actuadores.

5) Procedimientos de manejo, mantenimiento, sanitizaciones y muestreo.

6) Calificaciones del personal que atiende, de una manera u otra el sistema.

7) Ensayos documentados del funcionamiento de las alarmas del sistema (si las posee)

8) Registros de calibraciones de los instrumentos instalados

9) Listado de repuestos

10) Sistema actualizado de Control de Cambios

11) Plan de Muestreo pormenorizado (análisis a realizar, frecuencias, puntos a muestrear) con seguimiento (análisis de tendencia).

12) Revisión de todo desvío a lo especificado con investigaciones importantes y detalladas.

13) Procedimientos que demuestren fehacientemente que el agua, siempre que es utilizada para producción, ha sido recolectada y analizada previamente.

Mantenimiento y Revisiones del Sistema de Agua

Independientemente que el sistema sea nuevo o existente, éste debe ser mantenido de acuerdo con un programa controlado de mantenimiento que considere, al menos, lo que se indica a continuación:

- Frecuencias establecidas para los diferentes componentes
- Programa de calibraciones
- Procedimientos específicos para las tareas.
- Control de repuestos
- Emisión controlada de las tareas de mantenimiento y sus procedimientos.
- Revisión y aprobación del sistema para su uso luego de completarse las tareas.

- Registro y revisión de fallas encontradas durante las tareas de mantenimiento.

Sumado al Mantenimiento del sistema, cada cierto tiempo debe efectuarse una revisión del mismo con representantes de Ingeniería o Mantenimiento, Producción, Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad, evaluando los puntos que se indican a continuación:

- Cambios efectuados al sistema
- Desempeño del mismo
- Confiabilidad
- Tendencias
- Fallas
- Investigaciones desarrolladas
- Resultados fuera de especificaciones
- Documentación
- Libros de registro
- Listado de procedimientos actualizados.

Bibliografía

1. WHO *Guidelines for drinking-water quality*, 3rd edition. Geneva, World Health Organization, 2003.
2. *Water and steam systems*. International Society for Pharmaceutical Engineering, 2001. ISPE BaselineTM Pharmaceutical Engineering Guide, Volume 4.
3. American Society of Mechanical Engineers. *Bioprocessing Equipment Standard*. ASME — BPE 2000
4. *Guide to inspections of high purity water systems*. Maryland, US Food and Drug. Administration (FDA). 1993.
5. US Pharmacopoeia, USP 36.
6. Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme. PIC/S; Inspection of Utilities; P1 009-1. Geneva, Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme, 2002.
7. *Pharmaceutical Water, System Design, Operation and Validation*. William W. Collentro. Interpharm.1999

Capítulo III.5.

Biopelículas

Silvia Elena Rastelli

- *Formación y desarrollo de biopelículas*
- *Comunicación entre células*
- *Importancia de las biopelículas*
- *Técnicas aplicadas al estudio de biopelículas*
- *Mecanismos de prevención / mitigación de la formación de biopelículas*
- *Bibliografía*

Formación y desarrollo de biopelículas.

Una gran variedad de microorganismos está presente en todos los ambientes acuáticos (o muy hidratados), tanto naturales como industriales. Estos microorganismos constituyen comunidades multicelulares y presentan gran tendencia a fijarse y crecer sobre superficies bióticas o abióticas inmersas en el agua y formar películas biológicas, más comúnmente denominadas *biopelículas* o *biofilms* [1].

En las biopelículas, las bacterias viven agrupadas en acúmulos celulares tridimensionales, constituidos por microcolonias de diferentes células bacterianas aeróbicas y anaeróbicas. Se encuentran envueltas por el *material polimérico extracelular* (MPE), separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos (canales de agua), que permiten el flujo de líquido, nutrientes y oxígeno y remoción de desechos.

En ambientes naturales es frecuente encontrar microorganismos eucariotas como algas, protozoos y hongos junto a las bacterias, mientras que en ambientes naturales extremos, en ensayos de laboratorio o en sistemas de purificación de agua, se encuentran biopelículas constituidas casi exclusivamente por procariotas [2].

La transición de microorganismos que se desplazan en ambientes líquidos como células libres a estar fijos en superficies como parte de comunidades en biopelículas, sucede en diversas etapas que culminan en la formación de estructuras complejas de células: planctónicas, adheridas, estructuradas en microcolonias o macrocolonias, o desprendidas [3,4].

Si bien existen varios modelos y descripciones, el desarrollo de una biopelícula puede generalizarse en las siguientes etapas:

a) **Acondicionamiento**: se produce la instantánea adsorción de productos orgánicos con los cuales los microorganismos no están relacionados (película condicionante).

b) **Adhesión de especies bacterianas pioneras**: algunas bacterias se adhieren a la superficie sumergida en cuestión de horas.

c) **Colonización de otros microorganismos:** otras bacterias y hongos comienzan a asociarse a la superficie luego de la colonización de las pioneras en cuestión de días.

d) **Acumulación:** se produce el agregado de partículas, células muertas y compuestos de metales. Estos pueden encontrarse como productos de corrosión o como iones en solución.

En la Figura 1 puede observarse un esquema de formación de una biopelícula sobre un sustrato según Jenkinson and Lappin-Scott (2001)[5]. Su formación comienza con la ***adhesión*** de bacterias a una superficie previamente acondicionada, es decir, donde ya se ha producido la adsorción de materia orgánica proveniente del medio acuoso. Luego se produce la ***colonización*** de la superficie debido a la división de las células adheridas y a la liberación de MPE (ver detalles más adelante), posteriormente comienzan a ***acumularse*** hasta llegar a formar una comunidad en equilibrio o "***comunidad clímax***", en la que pueden distinguirse microorganismos sésiles (pegados a la superficie e inmóviles) y planctónicos (los que se mueven con el flujo de agua). La biopelícula madura, ya establecida, no se mantiene estática, sino que es una entidad dinámica y una vez alcanzado un tamaño crítico se produce su ***dispersión***: una parte de ella puede ser desprendida por el movimiento del líquido y redepositarse en otra zona donde el proceso se reiniciará.

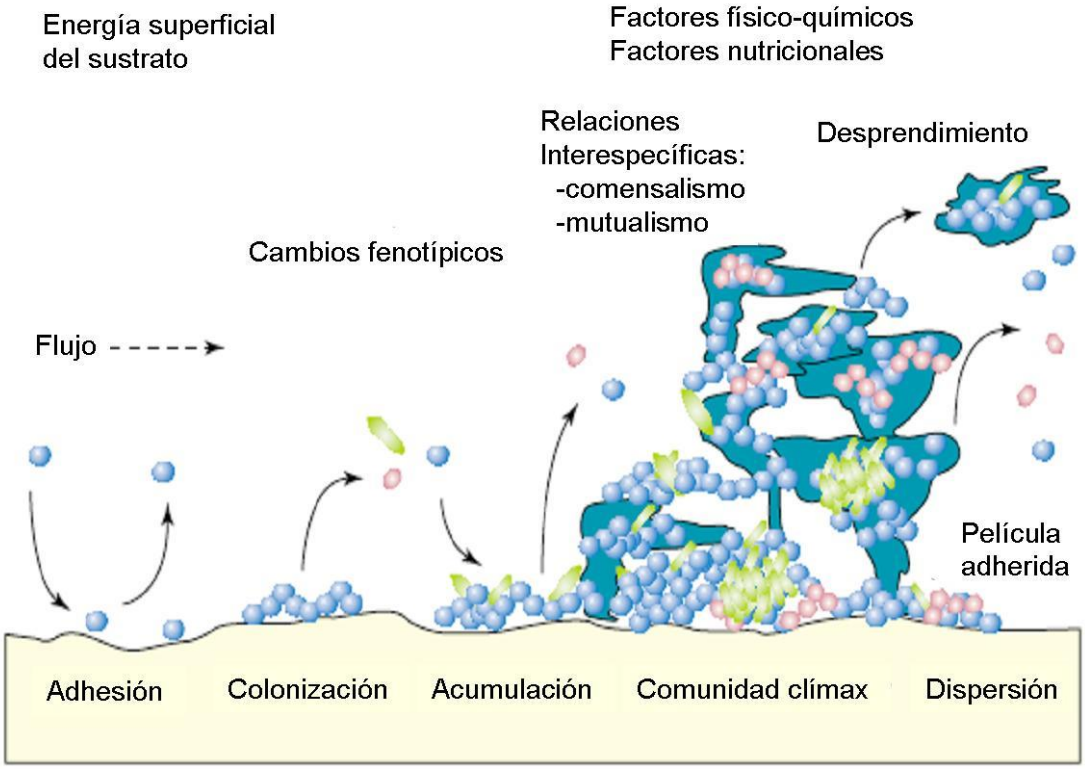


Figura 1. *Etapas de desarrollo de una biopelícula. Extraído y traducido de Jenkinson and Lappin-Scott, 2001[5].*

En el inicio de la formación de la biopelícula las células tienen que adherirse a un sustrato. En el laboratorio, el sistema en estudio se mantiene generalmente limpio para evitar errores que puedan derivarse de contaminantes, especialmente moléculas orgánicas. Sin embargo, en sistemas naturales no existen sustratos limpios: son rápidamente (en minutos) cubiertos con una delgada película de contaminantes orgánicos designados como película condicionante. La composición de esta película puede ser influenciada por las propiedades físico-químicas del sustrato. Si bien existen métodos de minimizar la adhesión microbiana, no se ha descubierto aun, un sustrato que inhiba totalmente dicha adhesión.

Las biopelículas constituyen un modo de crecimiento que permite a los microorganismos sobrevivir, aún en ambientes hostiles, siendo sus fenotipos, fisiología y comportamiento significativamente diferentes de sus contrapartes planctónicas [6,7], incluso biopelículas monoespecíficas demuestran vasta heterogeneidad en términos de metabolismo, expresión de genes y fisiología debido a las diferentes condiciones o microubicaciones.

Las características estructurales, químicas y fisiológicas de una biopelícula dependen no sólo de los microorganismos que la constituyen sino también de las condiciones ambientales locales (velocidad del flujo, presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos) y de las características de la superficie a colonizar (hidrofobicidad, carga, rugosidad, composición química). Esta combinación de todos los rasgos conduce a un

conjunto célula-superficie que establece la afinidad por el sustrato. Si la composición de la superficie de la célula o del sustrato cambia, la afinidad puede cambiar [2]. Es por ello que, organismos modelo tales como cepas con mutaciones definidas en su pared celular o una composición conocida de exopolímeros, y sustratos modelo cuyas características físico-químicas superficiales fueran conocidas son más adecuados para estudiar y predecir su tendencia a adherirse no-específicamente.

En la última década se han logrado grandes progresos en el esclarecimiento de mecanismos moleculares de adhesión bacteriana, comprensión de la estructura y composición de las biopelículas [3,8]. Algunos estudios se han ocupado de las consecuencias del crecimiento de las biopelículas o de las últimas etapas de su desarrollo. Por lo tanto, se sugiere que las biopelículas son mejor estudiadas desde un punto de vista espacio-temporal similar al de la biología del desarrollo [2]. Los esquemas generalizados de la formación de las biopelículas deben ser comprendidos y se los deben investigar en condiciones que sean equivalentes a las que experimenta cada biopelícula en particular cuando se desarrolla en la naturaleza.

Como se ha mencionado, un componente muy importante que mantiene la integridad estructural de la biopelícula lo constituye el MPE, también llamado matriz extracelular, generado en su mayor parte por los mismos microorganismos que la componen [5,7,9]. Esta matriz tiene un aspecto de gel y está constituida por proteínas, diversos iones como el Ca^{+2}, así como también productos de corrosión, sedimentos y partículas del entorno, cadenas de polisacáridos y agua que permiten la cohesión entre las células y las protegen de las condiciones hostiles del medio.

La masa de material polimérico se comporta como una membrana de intercambio iónico debido a su alto grado de hidratación. La estructura total de la biopelícula puede asimilarse a un sistema dinámico gobernado por diversos mecanismos de transporte que tienen lugar en su espesor.

Comunicación entre células

Las bacterias utilizan una amplia variedad de mecanismos para comunicarse entre ellas y, en los casos de infecciones, con sus huéspedes eucariotas. Entre estos mecanismos se pueden mencionar canales de señales químicas de largo y corto alcance; comunicación en un sentido, en ambos sentidos y en múltiples sentidos y señalización mediada por el contacto.

El comportamiento social llevado a cabo por las bacterias para formar las biopelículas es debido a una interacción molecular, que funciona como un sistema de comunicación célula-célula, denominado *quorum sensing* (QS). Durante muchos años se consideró que el fenómeno de señalización química entre células estaba limitado a un cierto grupo de especies, sin embargo, actualmente se sabe que la comunicación intercelular no es excepcional, sino que es una norma en el ecosistema bacteriano y es fundamental en la formación de biopelículas [10].

En este sistema, las bacterias se "comunican" su presencia entre sí, liberando y respondiendo a la acumulación de "señales" mediante compuestos químicos autoinductores, logrando así la expresión coordinada de genes de respuesta (Figura 2). Es posible, también, encontrar el término sociomicrobiología para el estudio de este comportamiento [11,12].

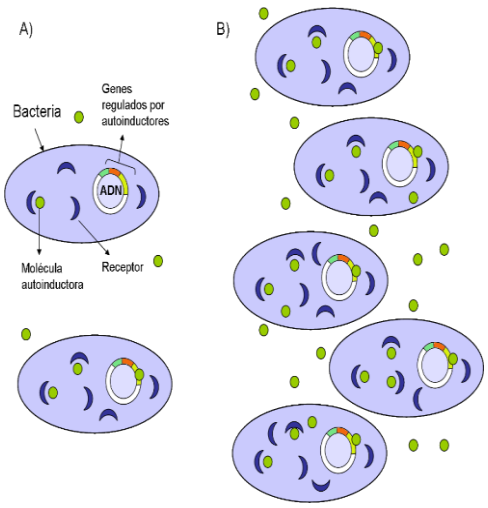


Figura 2. *Representación esquemática del sistema de comunicación célula-célula en una biopelícula.* ***A)*** *la densidad poblacional bacteriana es baja, por lo tanto la concentración de la molécula autoinductora (puntos verdes) también es baja.* ***B)*** *la población ha aumentado, y como consecuencia la concentración del autoinductor es alta, lo que activará una señal de respuesta.*

Los procesos regulados por el mecanismo de QS son, en general, improductivos a nivel de las bacterias individuales pero efectivos cuando se llevan a cabo por el grupo celular. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. Es decir, que si está presente el número adecuado de células bacterianas en la vecindad, se desarrollará una biopelícula. Por el contrario, los costos de producción de una biopelícula para una bacteria individual superarían los beneficios [13,15].

Las principales moléculas señalizadoras o autoinductoras empleadas por bacterias Gram-negativas para comunicarse con las demás bacterias son las acil-homoserina-lactonas, mientras que en las Gram-positivas prevalecen los oligopéptidos modificados. Las bacterias también poseen un receptor que puede detectar específicamente el autoinductor respectivo. Cuando éste se une al receptor, activa la trascripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor [16].

Además de la formación de biopelículas existen otros procesos fisiológicos regulados por el QS, entre los que pueden citarse la expresión de factores de virulencia, la resistencia a antibióticos [17,18] y a metales pesados, movimientos colectivos como el *swarming*, la simbiosis, la competencia interespecífica, la esporulación y la conjugación [19]. En el caso de microorganismos patógenos, este fenómeno les permite alcanzar un nivel de población lo suficientemente elevado como para que, llegado el momento de producir los factores de virulencia tras alcanzar el quórum, puedan contrarrestar las defensas del huésped e invadir otras regiones de ese organismo con mayor probabilidad.

Existen diferentes vías de regulación complejas que integran señales ambientales a través de las cuales se generan respuestas adecuadas (Figura 3).

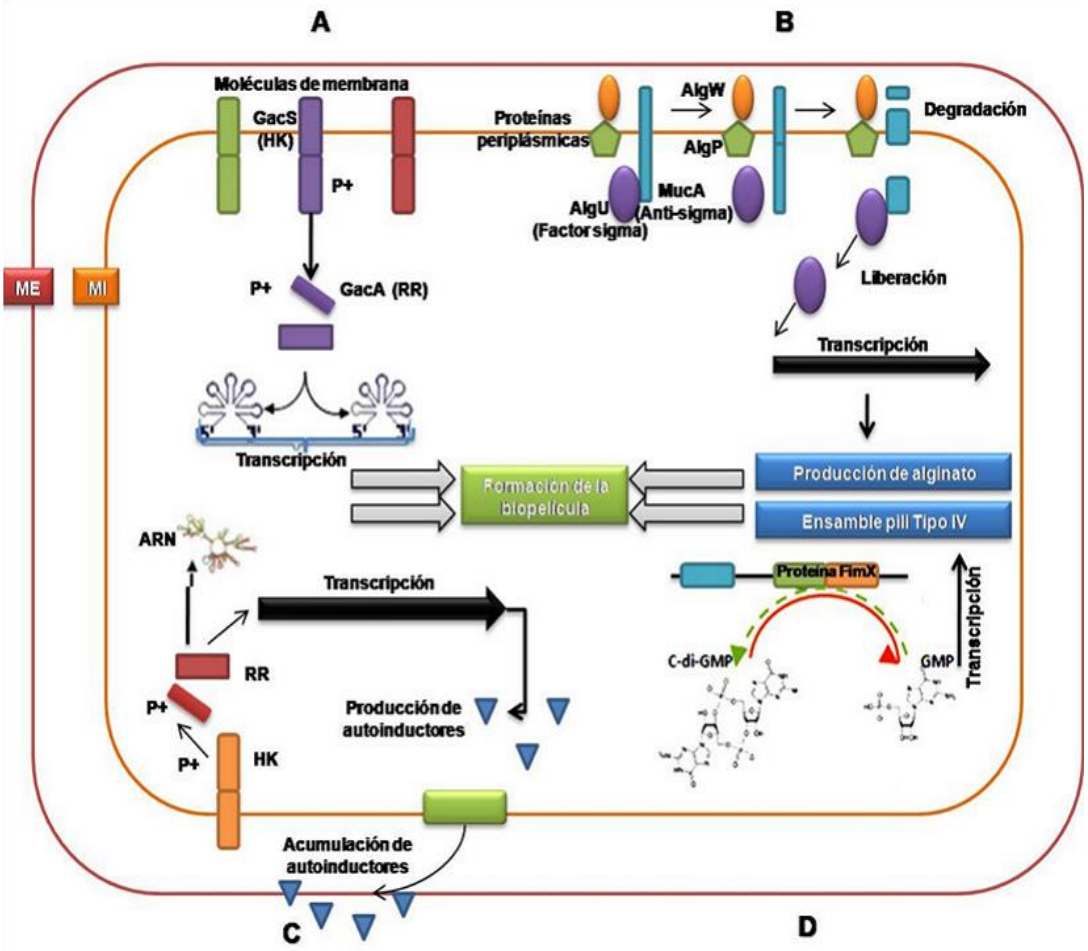


Figura 3. *Vías de regulación que controlan la transición entre bacterias planctónicas y la formación de biopelículas. Representación de mecanismos presentes en las bacterias Gram- (A, B y D) y Gram+ (C).* ***A****) Formación de la biopelícula en Pseudomonas aeruginosa mediante la vía TCS,* ***B****) Control de la producción de MPE en P. aeruginosa vía ECF,* ***C****) Control de la formación de biopelículas en Staphylococcus aureus a través de la vía QS,* ***D****) Control de la formación de biopelícula en P. aeruginosa a través de la vía de segundos mensajeros c-di-GMP. ME: membrana externa; MI: membrana interna. Extraído de Bordi y Betzmann, 2011[17], traducido por Loera Muro 2012[21]*

Entre estas vías se encuentran: los sistemas de dos componentes (TCS: "two-component systems"), las rutas de señalización de función extracitoplásmica (ECF: "*extracytoplasmic function*"), los sistemas QS y otras moléculas, donde se incluye al c-di-GMP como segundo mensajero [17]. Los TCS (Figura 3.A) y el ECF (Figura 3.B) son los principales mecanismos empleados por las bacterias para monitorear el medio externo e interno. Se monitorean nutrientes, iones, temperatura, estado redox, que se traducen en respuestas adaptativas[17]. Como ya se ha mencionado, el sistema de respuesta multicelular o QS (Figura 3.C) coordina la expresión de genes necesarios para la formación de la biopelícula y detecta, mediante moléculas autoinductoras la densidad del consorcio [17,20]. Finalmente, la vía de señalización mediante el segundo mensajero c-di-GMP (Figura 3.D), estimula la formación de biopelículas mediante la producción de organelas de adhesión, la síntesis de MPE y la disminución de la movilidad de las células [17].

Importancia de las biopelículas

Es sabido que muchas biopelículas ejercen un efecto negativo y perjudicial sobre diferentes actividades humanas. Se puede citar como ejemplos la formación de la placa dental (Figura 4.A) y las infecciones por biopelículas en prótesis o en implantes quirúrgicos (Figura 4.B), las cuales son difíciles de erradicar porque se encuentran protegidas contra macrófagos y antibióticos comparadas con células aisladas, conduciendo al rechazo del implante [20] o derivando en complicaciones clínicas generalmente con riesgos de vida. También, la resistencia y persistencia de microorganismos patógenos en sistemas de circulación y almacenamiento, que alteran la calidad del producto transportado [2,22], esto se ve reflejado en sistemas de distribución de agua potable y purificada, en la industria lechera, en la industria farmacéutica y cosmética, así como en el proceso de fabricación de papel [23]. Otra problemática en estos sistemas es el desarrollo de biopelículas corrosivas [22] (Figura 4.C). La acción de los polímeros presentes en el MPE depositados sobre los sustratos metálicos es la clave para entender los fenómenos de corrosión microbiológica. Los cambios en el tipo y concentración de iones, en los valores de pH y niveles de oxígeno pueden modificar el estado pasivo del metal o la composición o distribución de los procesos de corrosión.

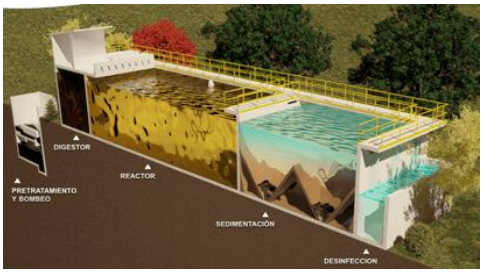
Sin embargo, también existen biopelículas con efectos beneficiosos, es decir que son aprovechadas por el ser humano. Se pueden mencionar: plantas de tratamiento de agua y procesos industriales basados en el uso de lodos activados (Figura 4.D); procesos de biorremediación en los que se utilizan comunidades o consorcios de microorganismos para recuperar ambientes contaminados (Figura 4.E); y procesos de biolixiviación en los que se produce la disolución de minerales por parte de las bacterias liberando el metal a obtener.

A) Placa dental

B) Implantes quirúrgicos

C) Biopelículas corrosivas

D) Tratamiento de aguas con lodos activados



E) Biorremediación de ambientes contaminados

Figura 4. *Diferentes ejemplos de biopelículas con efectos* ***A-C)*** *perjudiciales [24-26] y* ***D-E)*** *beneficiosos [27,28] para el ser humano.*

Técnicas aplicadas al estudio de biopelículas.

Los efectos de la interacción entre los más variados materiales estructurales y los microorganismos presentes en aguas ya se reflejaban en la literatura internacional desde la década de 1970. Convencionalmente, muchos estudios e investigaciones sobre biopelículas se centraron siguiendo procedimientos *ex situ,* sobre biopelículas removidas de la superficie mediante raspado, tratamiento ultrasónico, remoción con solventes, etc. y la posterior evaluación de la capacidad y secuencia de formación de biopelículas basadas en la adsorción de biopolímeros, así como estudios de crecimiento y colonización del material raspado mediante recuento en placa. Esta metodología tiene dos limitaciones principales: por un lado, los cultivos en medios nutritivos no involucran a la totalidad de la comunidad bacteriana, ya que un 99.9% de las bacterias de una biopelícula no pueden ser cultivadas en un medio estándar [29] y por el otro, la eliminación de las características esenciales de la complejidad y organización estructural de la biopelícula.

Ambas problemáticas se han ido esclareciendo a través del desarrollo de técnicas de microbiología molecular, es decir metodologías independientes del cultivo, y de técnicas de análisis *in situ*, que han permitido un mejor entendimiento de los procesos a esta microescala.

Entre las técnicas moleculares, la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*) y la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) son las más utilizadas. Entre los métodos *in situ* se pueden mencionar: técnicas de química superficial, biofísica, bioquímica, inmunología e ingeniería de transferencia de calor. En tal sentido, en estos estudios se han empleado exitosamente técnicas como la espectroscopia infrarroja, elipsometría, medidas de potencial superficial, determinaciones de ángulo de contacto, microscopía electrónica de barrido, análisis elemental dispersivo en energía y difracción de rayos X.

La técnica de DGGE[30], requiere primero de la extracción de ADN de cada comunidad a estudiar y la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores con "clamp" o "cola" GC (guanina-citocina). Posteriormente, el producto de PCR se siembra en un gel de poliacrilamida con un gradiente lineal desnaturalizante, los geles se llevan a una cuba con buffer para realizar la electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñe, se observa y se fotografía en un transiluminador. Durante la electroforesis en gel, cuando un fragmento de ADN de un determinado tamaño y secuencia se encuentra en las condiciones que producen su desnaturalización, se separa la doble hélice y la migración de dichas cadenas se detiene o es considerablemente más lenta. El punto de desnaturalización de un fragmento de ADN varía con el tamaño y composición de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, que suele aumentar con altos contenidos de G y C, estas diferencias se ven reflejadas en las diferentes bandas presentes en cada perfil genético (Figura 5.A).

Conceptos de ecología como *comunidad*, *consorcio*, *riqueza*, *abundancia*, *diversidad, sucesión*, son importantes a tener en cuenta a la hora de estudiar las biopelículas, ya que es la ecología la responsable de su efectividad. Cambios en las condiciones ambientales pueden alterar la composición de la biopelícula y, consecuentemente, su funcionamiento[2,22]. Los perfiles genéticos obtenidos mediante geles de DGGE permiten analizar la composición, la diversidad, la dinámica y la filogenia de una comunidad y compararla con otras [31]. Esta técnica se ha aplicado, por ejemplo, para identificar especies dominantes que influyen tanto en la inhibición como en la estimulación de la corrosión[32], comparación de comunidades desarrolladas sobre diferentes sustratos en ausencia y presencia de As(V) (Figura 5.B) [33], para analizar la composición de las biopelículas en las diferentes etapas en el tratamiento del agua potable [34], etc.

La técnica de FISH (Figura 6.A), es una técnica citogenética (*in situ*), desarrollada a principio de la década de 1980, que utiliza sondas de oligonucleótidos marcadas con un colorante fluorescente que se unen (o hibridan) en sitios específicos del ADN con un alto grado de complementariedad de secuencias. La microscopía de fluorescencia se utiliza para averiguar dónde se une la sonda fluorescente a los cromosomas. Es por ello que el FISH se utiliza en el asesoramiento genético, en medicina, en la identificación de especies [35], para detectar y localizar objetivos específicos de ARN (mRNA, lncRNA y miARN), así como para la observación de morfología, ubicación, abundancia y actividad celular, tanto en células procariotas como eucariotas.

En cuanto a las técnicas *in situ*, posiblemente la más rápida y sensible técnica conocida para identificar cambios en la constitución superficial de cualquier material, está basada en la medida de ángulo de contacto. Los métodos ampliamente desarrollados durante varias décadas por el Dr. William A. Zisman y sus colaboradores en el *Naval Research Laboratory*, EEUU, dieron lugar a una vasta literatura sobre propiedades de líquidos y sólidos que constituyen valiosos aportes a las investigaciones sobre biopelículas.

Los espectros infrarrojos de reflexión interna (IR *signature*) muestran los estadios más incipientes de formación de biopelículas como la primera evidencia de adsorción sobre materiales. La secuencia de espectros durante diversos tiempos de inmersión en agua revela el crecimiento de la biomasa depositada sobre determinado sustrato en dicho momento. Desde una proteína detectable en la película seca, pasando por un incremento del espesor en la respectiva banda debido a su acumulación, hasta los cambios asociados a su hidratación o a un subsiguiente estado hidroxilado. Al cabo de un mayor período de seguimiento se detectan adicionalmente bacterias aisladas y posterior engrosamiento del depósito por incremento en el número de células, así como la presencia de flagelos y de nuevas estructuras de anclaje al sustrato.

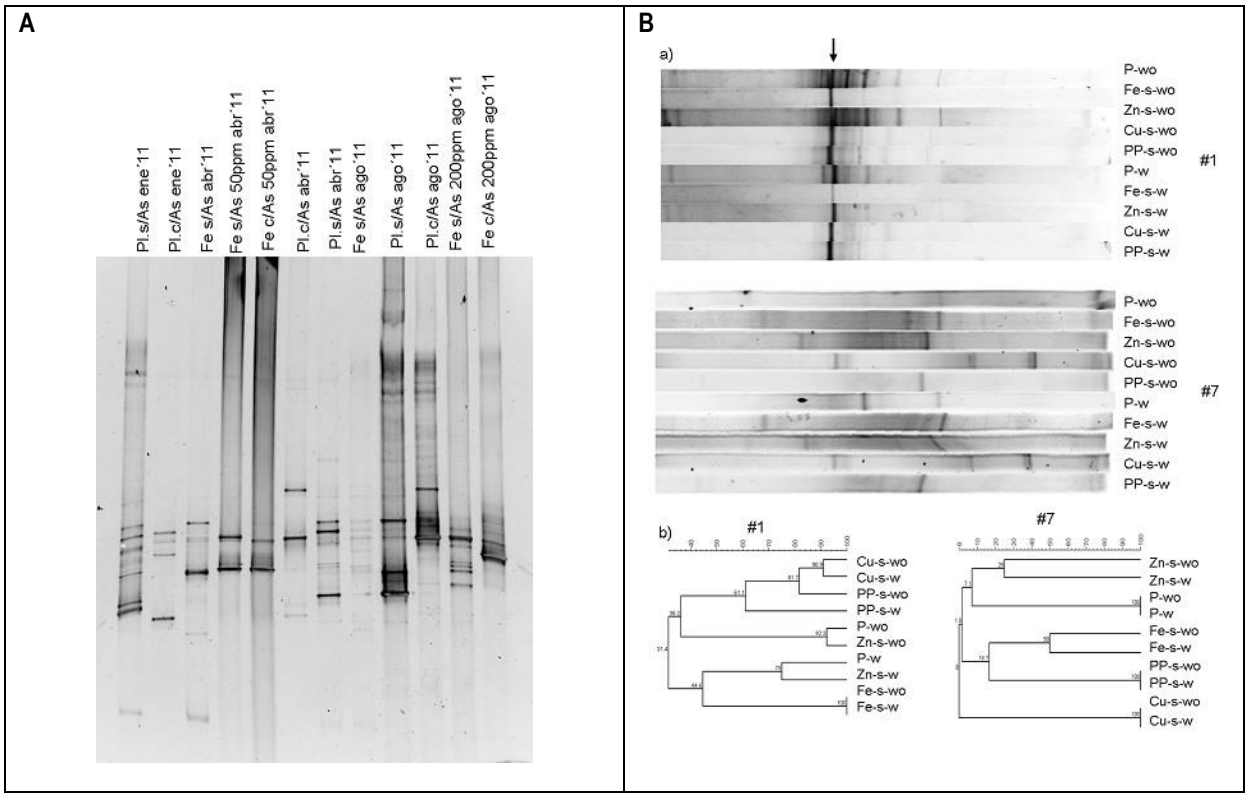


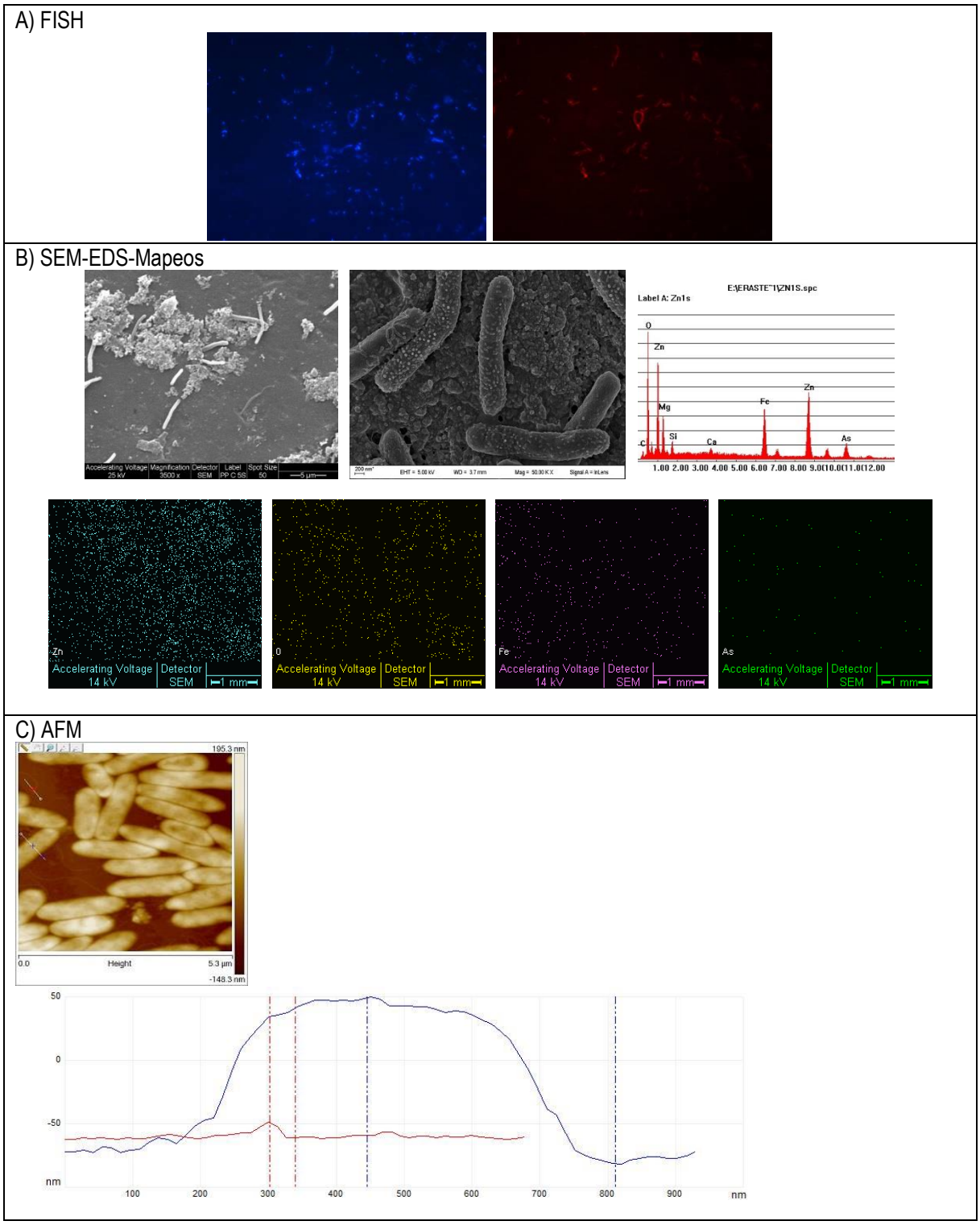
***Figura 5**. Geles obtenidos por DGGE. **A)** Comunidades planctónicas y sésiles (biopelículas) desarrolladas sobre cupones de Fe en presencia de diferentes concentraciones de As(V) **B)** a) Comunidades planctónicas y biopelículas desarrolladas sobre diferentes sustratos (Fe, Zn, Cu y PP) en presencia y ausencia de As(V); b) Relación filogenética de las comunidades presentes en los geles.* [33]

A partir de la espectroscopía atenuada de reflectancia total-transformada de Fourier (ATR-FTIR), se ha podido explicar cómo las células bacterianas embebidas más profundamente en la matriz de exopolímeros accedían a los nutrientes del seno de un fluido. También esta técnica ha posibilitado la comprensión de cómo ciertos agentes antibacterianos podían penetrar hasta el sustrato colonizado sin matar a las bacterias ubicadas más superficialmente en la biopelícula.

La elipsometría, otra de las técnicas utilizadas, consiste en la medición del cambio en el estado de polarización de un haz de luz en la reflexión de la muestra de interés. La naturaleza exacta del cambio de polarización se determina por las propiedades de la muestra (grosor e índice de refracción). Esta permite la caracterización de una amplia gama de propiedades, como el espesor de capa, las constantes ópticas, la composición química, la cristalinidad, la anisotropía y la uniformidad, a través del análisis del estado de polarización de la luz que refleja la muestra. Se pueden lograr determinaciones de espesor que oscilan desde unos pocos angstroms a decenas de micras, y son posibles para capas individuales o pilas de múltiples capas complejas.

Otras técnicas muy difundidas y utilizadas para estudios *in situ*, son las diversas microscopías [36,50]. Si bien se presenta la dificultad para caracterizar algunos procesos debido al alto grado de hidratación de las biopelículas, el avance tecnológico y el desarrollo de los microscopios electrónicos de barrido (SEM, *scanning electron microscope*) y barrido ambiental (ESEM, *environmental scanning electron microscope*) en combinación con

diferentes técnicas de tinción y el uso de programas de computación adecuados, han permitido una visualización a elevada resolución de las características, estructura y estadios de formación de las biopelículas [40]. La observación de muestras en el SEM requiere tratamientos de fijación, deshidratación, secado y metalizado con un revestimiento conductor, previos a la toma de imágenes, las que se realizan en alto vacío. Todos estos procesos pueden alterar la estructura y las características de la biopelícula originaria[41]. Como ventaja, las observaciones en el ESEM no requieren de ningún pretratamiento de las muestras y se pueden tomar imágenes a bajo y medio vacío y en atmosfera húmeda, lo que preserva la morfología original de la biopelícula [37,40,42]. En ambos microscopios de barrido, mediante rayos X y espectroscopía dispersiva en energía (EDS, *energy dispersive spectroscopy*), se puede obtener un análisis semicuantitativo de los elementos químicos presentes, así como su distribución sobre el sustrato en estudio (Figura 6.B).



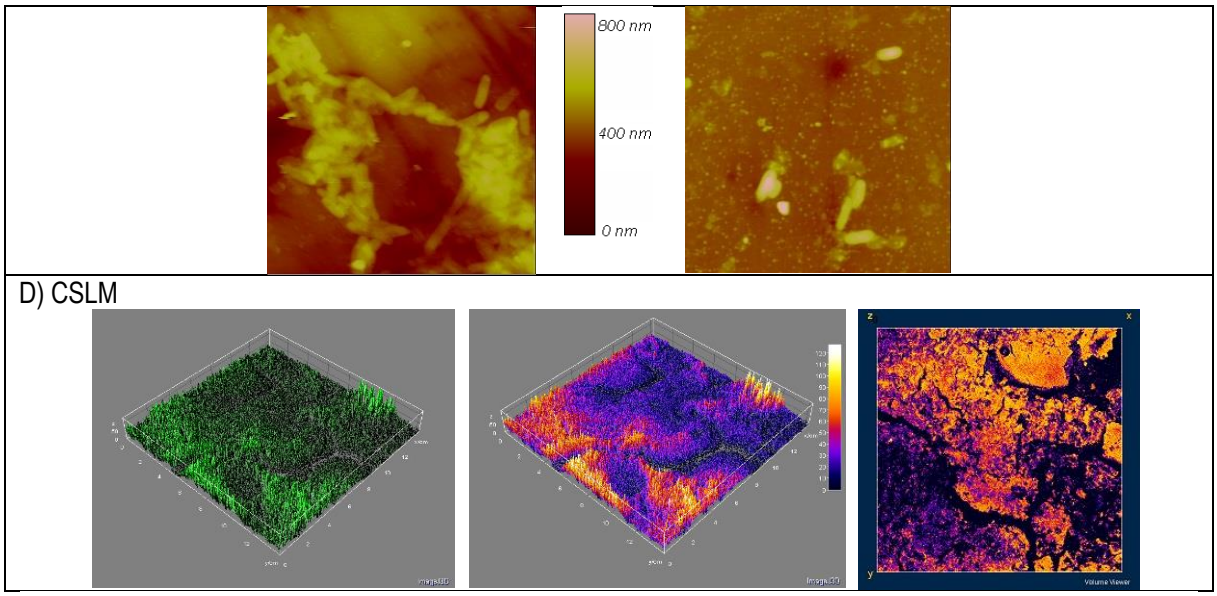


Figura 6. A) *FISH: en azul, fluorescencia del DAPI que hibrida con el ADN bacteriano total; en rojo, sonda específica que hibrida sólo con eubacterias. Fotos gentileza Dra. Marisa R. Viera, (CIDEPINT, CONICET).* ***B)*** *SEM: biopelículas sobre diferentes sustratos, análisis de espectroscopía dispersiva de rayos X, mapeo de algunos elementos químicos (Zn, O, Fe, As) presentes en una biopelícula. Fotos e Imágenes Lic. Silvia E. Rastelli (CIDEPINT, CONICET).* ***C)*** *AFM: arriba: biopelícula de Pseudomonas fluorescens formada sobre un sustrato de oro y gráfico de la sección transversal a lo largo de las líneas en la imagen (la línea azul permite medir la altura de la bacteria; la línea roja la altura del flagelo). Imágenes gentileza Dra. Carolina Díaz, (INIFTA, UNLP-CONICET); abajo: P. aeruginosa incubada en una superficie de Ti y de Ti con nanopartículas de Ag como agente antimicrobiano. Gentileza Dra. Patricia Shilardi (INIFTA, UNLP-CONICET)[43].* ***D)*** *CSLM: diferentes reconstrucciones 3D de una biopelícula formada sobre un sustrato de Zn. Imágenes Lic. Silvia E. Rastelli (CIDEPINT, CONICET).*

Las técnicas analíticas en microscopía de fuerza atómica (AFM, *atomic force microscopy*) desarrolladas para este tipo de estudios permitieron apreciar notables detalles de las poblaciones bacterianas formadoras de biopelículas sobre metales [44,46]. Comparada con el ESEM, esta técnica provee una visión más realista y en la escala de los nanómetros de la superficie celular y del ordenamiento espacial del material extracelular que la rodea [44]. El AFM muestra el recorrido de la superficie en los 3 ejes (X, Y y Z), dando el máximo nivel de detalle topográfico de la configuración celular, del material polimérico y la ubicación espacial de fallas producidas en un sustrato [47] (Figura 6.C).

El microscopio láser confocal (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) en combinación con diferentes protocolos de tinción ha ido incrementando su importancia ya que no sólo permite observar el aspecto o estructura externa, sino también la morfología, distribución espacial interna y la cuantificación de células de manera no invasiva de diversas muestras biológicas, incluyendo las biopelículas [48,49]. Además, el uso de modelos matemáticos y la aparición de nuevos softwares permiten reconstruir la estructura tridimensional de la biopelícula en estudio [49,51] (Figura 6.D).

Otras técnicas también utilizadas para el estudio de superficies, son las técnicas electroquímicas. El potencial de corrosión o potencial a circuito abierto, es la diferencia de potencial entre el ánodo y cátodo, cuando no hay corriente neta circulando. Se mide determinando la diferencia de potencial entre el metal y un electrodo de referencia. Este método permite evaluar, mediante curvas de polarización, las propiedades, características y/o actividad de una biopelícula desarrollada sobre un metal [52], como por ejemplo su actividad corrosiva, incluso hasta el picado o el efecto barrera que ejerce la biopelícula sobre dicho sustrato.

Como se ha expuesto, cada una de las técnicas genera un muy variado tipo de información, pero en conjunto proveen un fructífero enfoque, especialmente cuando se las aplica de manera combinada [37,38,48,53-55].

Mecanismos de prevención / mitigación de la formación de biopelículas.

La predicción del riesgo y la velocidad de desprendimiento de biopelículas debidas a los esfuerzos mecánicos de corte durante la circulación del fluido ha sido una prioridad en la comprensión del bioensuciamiento de sistemas

de distribución de agua en todo tipo de industria. Tales desprendimientos constituyen la base de la propagación del fenómeno a lo largo del sistema, reduciendo la calidad del producto transportado, incrementando los costos de producción, constituyendo además, el grave riesgo de distribución de gérmenes patógenos en la población.

La comprensión de mecanismos que permitieran explicar tales hechos fue considerada esencial para desarrollar soluciones a los problemas de ingeniería debidos a las biopelículas microbianas. Como resultado de numerosas investigaciones y la aplicación de las técnicas anteriormente mencionadas en combinación con sofisticado instrumental y novedosos procedimientos, los avances científicos lograron dilucidar características de las biopelículas que permitieron evitar y/o minimizar muchos de los problemas industriales, ambientales y médicos detectados.

Si bien lo ideal sería poder prevenir la formación de biopelículas sobre los sustratos, aún no se conoce una técnica que impida o controle satisfactoriamente este proceso, sin causar efectos indeseables[56].

No hay prácticamente referencias en la literatura técnica disponible sobre biopelículas en los procesos de manufactura. El mayor énfasis en el control de biopelículas en esta aplicación es evitar la contaminación mediante el mantenimiento de la limpieza de la planta. Se recomienda el continuo monitoreo del estado de la higiene de la planta, incluyendo la inspección visual y el muestreo periódico para efectuar conteos bacterianos.

Una de las principales estrategias es la limpieza y desinfección periódica antes de que los microorganismos puedan fijarse definitivamente a un sustrato [56].

Entre los parámetros más importantes a tener en cuenta para prevenir la formación de biopelículas, se encuentran el diseño de los equipos, la elección de los materiales para su construcción y el acabado de las superficies. Es sabido que defectos y rugosidades no sólo favorecen la formación de biopelículas sino que dificultan su limpieza y eliminación[2,56]. El material más conveniente para el equipamiento de procesos es el acero inoxidable, el cual debe tener una adecuada terminación superficial, como cepillado, “lapping” y pulido electrolítico o mecánico. Un requisito previo para un eficiente programa sanitario es que el diseño de los equipos haya sido realizado teniendo en mente elevados estándares de higiene. Espacios muertos, esquinas, grietas, empaquetaduras, válvulas y juntas son puntos especialmente vulnerables a la acumulación de biopelículas [57].

Así, por ejemplo en la industria farmacéutica, las cañerías utilizadas son de acero inoxidable 360 con pulido a espejo y soldaduras orbitales, con pendientes siempre descendentes, y canillas y toma-muestras sanitarias que no permitan la acumulación de agua. También es importante mantener el flujo turbulento en las cañerías y una recirculación constante o a determinados intervalos.

Una manera de impedir el desarrollo de una biopelícula es modificando el sustrato o su capacidad de adherencia no-específica en condiciones controladas. Sin embargo, a medida que la diversidad de microorganismos aumenta, la posibilidad de limitar el crecimiento de la biopelícula disminuye. Como la alteración de la composición de la película condicionante puede afectar la adherencia de microorganismos específicos, modificar el sustrato para inhibir la adsorción de ciertas clases específicas de moléculas es otra forma de controlar la adhesión. Estos enfoques generalmente no funcionan en situaciones naturales complejas, pero pueden resultar exitosos en condiciones más controladas a las cuales están expuestas, por ejemplo, catéteres y prótesis médicas.

Asimismo, como la adherencia resulta de la interacción química entre la célula y el sustrato, se podrían realizar intentos de combatir los estadios iniciales de formación de la biopelícula modificando la película orgánica condicionante. Eventos de reconocimiento célula-célula que influencian la formación de biopelículas multi-específicas ofrecen una oportunidad de intervenir en la composición de la comunidad. Una mayor comprensión de cómo interactúan metabólicamente los microorganismos dentro de la biopelícula resultaría en una estrategia de intervención basada en la fisiología de la comunidad.

En sistemas de tuberías de sustancias líquidas no destinadas para consumo humano, es posible incorporar productos antimicrobianos a las superficies mediante la aplicación de recubrimientos o cambiando las propiedades físico-químicas de la superficie (Figura 6.C). Está demostrado que el agregado de amonio cuaternario, plata, y una amplia variedad de surfactantes modifica la capacidad de adhesión de las células disminuyendo la formación de biopelículas.

En el caso de la industria farmacéutica, la materia prima más empleada es el agua purificada. El deterioro de la calidad microbiológica de dicha agua puede afectar la calidad y seguridad de los productos[56]. Las biopelículas presentes en sistemas de almacenamiento y distribución de agua purificada son difíciles de detectar, inactivar y eliminar. Cabe destacar que en este tipo de industria, el único antimicrobiano que puede agregarse en un sistema

de agua purificada es el ozono, el cual no es considerado una sustancia agregada debido a la baja vida media, y debe tomarse la precaución de eliminarse dicho compuesto, por medio de luz UV, antes de que el agua sea utilizada.

Estudios realizados por Florjanic y Krist (2006)[58] reportan el impacto de dos regímenes para la desinfección de un sistema de agua purificada con ozono en función de la concentración y el tiempo, durante desinfecciones semanales. Con esta metodología se han obtenido resultados favorables, sin embargo se han destacado sitios críticos de contaminación microbiana en el sistema de distribución de agua purificada y que los niveles especificados de ozono previenen la formación de biopelículas en el sistema hasta un determinado límite, a partir del cual se pueden poner en riesgo la calidad del agua y aun esporádicamente, liberarse microorganismos al agua.

La actual comprensión de la fisiología y microecología son resultado de estudios *in vitro* en los que se usan modelos de biopelículas. Tales modelos se pueden utilizar para replicar condiciones de laboratorio o enfocar el efecto de diversas variables, como el impacto de la hidrodinámica, concentración de nutrientes y antimicrobianos en el crecimiento de biopelículas. Consecuentemente, el enfoque para diseñar un sistema y sus características operacionales debe ser desarrollado para cada caso en particular. Un relativamente nuevo método de laboratorio para investigar biopelículas en sistemas de agua purificada es el reactor anular de biopelículas (BAR) [59], aunque aún son escasos los estudios publicados en cuanto a la bioestabilidad del agua purificada empleando este dispositivo.

El intento de inhibir la formación de biopelículas mediante la limitación de la fuente de C ha resultado inadecuado, ya que se ha detectado la presencia de biopelículas hasta en sistemas con agua ultra pura [60].

En otros sistemas de distribución y/o almacenamiento, es posible aplicar otros mecanismos de control de las biopelículas como la adición de biocidas. Estos, son sustancias químicas destinadas a destruir, contrarrestar, neutralizar o ejercer un efecto de control sobre cualquier organismo nocivo para la salud (humana o animal) o que causan daño a productos naturales o manufacturados. Son sustancias con poca selectividad, deben ser compatibles con el sistema, ambientalmente aceptables, efectivos a bajas concentraciones, perdurables en el tiempo, y si de biopelículas se trata, deben ser efectivos contra organismos planctónicos y sésiles.

En la aplicación de un biocida, es importante saber, que éste tendrá diferentes efectos en función de los microorganismos sobre los que actuará, por ejemplo si son bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, si son aerobias o anaerobias y si este metabolismo es estricto o facultativo. En consecuencia, los biocidas pueden tener un efecto bacteriostático o bactericida, causar un daño o efecto reversible o irreversible de acuerdo a la concentración aplicada, al tiempo de contacto o exposición entre el biocida y los microorganismos, si se utiliza un solo biocida o en combinación con otros[61]. Hay censores desarrollados, capaces de detectar tempranamente la presencia de una biopelícula y de estimar cuándo desinfectar y cuánto desinfectante o biocida adicionar para proteger una superficie [62,63].

Según su mecanismo de acción, los biocidas pueden clasificarse en dos grandes grupos. Por un lado, los biocidas *electrofílicos:* que reaccionan con enzimas en el citoplasma impidiendo el metabolismo y el crecimiento y por lo tanto causando la muerte del microorganismo. Dentro de este grupo podemos mencionar los de efecto oxidante como el bromo, cloro y ozono, y los electrofílicos propiamente dichos como isotiazolonas y aldehídos. Por otro lado están los biocidas de tipo *membrana-activos*, que producen disrupción de la membrana plasmática haciendo que ésta pierda su funcionalidad tanto física como química. Entre estos, se encuentran los líticos como amonio cuaternario, fenoles y alcoholes y otro grupo donde se incluyen ácidos débiles y parabenos.

En sistemas de agua potable, para la eliminación de los microorganismos patógenos, es posible adicionar cloro libre, cloraminas o dióxido de cloro como desinfectantes. Para eliminar una biopelícula ya formada, lo mejor es el uso de vapor limpio, o en caso de no ser posible, se realiza un tratamiento con bisulfito. Si aún persiste, se utiliza una mezcla estabilizada de peróxido de hidrógeno y ácido peracético.

En algunos sistemas, también son utilizados, los denominados "químicos verdes"[56], entre los que se encuentran enzimas, fagos y metabolitos. Dada la heterogeneidad de los sistemas, suele ser necesario adicionar una mezcla de enzimas para lograr la degradación de una biopelícula. Además se ha encontrado un efecto sinérgico cuando se aplican enzimas proteolíticas y glucolíticas junto con ondas ultrasónicas, así como también en combinación con detergentes, surfactantes y antimicrobianos fenólicos. Lamentablemente estas técnicas aún no son tan usadas debido a su elevado costo respecto de otros químicos convencionales.

Como se mencionó al principio de este capítulo las bacterias usan el sistema de QS para comunicarse y formar biopelículas. Una mejor identificación de estos procesos, así como de los productos que actúan como señales célula-célula, permitiría desarrollar una nueva y más eficiente forma de control mediante la identificación de productos que pudieran actuar como antagonistas del QS.

Para llevar adelante un efectivo control de biopelículas es fundamental comprender el tipo y la naturaleza de los residuos contaminantes (hidratos de carbono, grasas, proteínas, sales minerales) y de los microorganismos que hay que desprender de las superficies. Además, la selección de detergentes y desinfectantes debe hacerse en base a su efectividad, seguridad y facilidad de eliminación, en especial en función de la naturaleza corrosiva de los posteriores tratamientos químicos y los efectos sensoriales en los productos finales [64,65]. Una mayor remoción de residuos en los enjuagues previos contribuye, en posteriores esfuerzos, a reducir la cantidad de productos de limpieza usados.

La biología de biopelículas es un campo que requiere de muy básicas y extremadamente cruzadas disciplinas y a veces investigaciones esotéricas. Sin embargo, esa investigación sentará las bases de la verdadera comprensión de problemas complejos tales como la corrosión influenciada por microorganismos y enfermedades orales y contribuirá grandemente a nuestra comprensión de los más significativos estilos de vida en la tierra.

Bibliografía

1. Dexter S.C. ASM Handbook. *Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection*, Vol.13, A, p. 398-416, 2003.

2. Palmer R.J. Jr. and White D.C. *Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control*. Trends in Microbiology, Vol. 5, (11), p. 435-440, 1997.

3. Monds R.D., O'Toole G.A. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review.* Trends in Microbiology Vol. 17, p. 73–87, 2009.

4. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G. and Costerton J.W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annual Review of Microbiology Vol. 56, p.187–209, 2002

5. Jenkinson H.F and Lappin-Scott, H.M. *Biofilms adhere to stay*. Trends in Microbiology, Vol. 9, (1), p. 9-10, 2001.

6. Branda S.S., Vik A., Friedman L. and Kolter R. *Biofilms: the matrix revisited*. Trends in Microbiology Vol.13 (1), p. 20-26, 2005.

7. Shirtliff M.E, Mader J.T. and Camper A.K. *Molecular Interactions in Biofilms*. Chemistry & Biology, Vol. 9, p. 859–871, 2002.

8. Karen O. *Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion*. Res. Microbiol. Vol. 159, p. 415–422, 2008.

9. Beech I.B., Sunner J.A. and Hiraoka K. *Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes.* International Microbiology, Vol.8, p.157-168, 2005.

10. Bassler B.L. and Losick R. *Bacterially speaking.* Cell, Vol.125, p. 237-246, 2006.

11. Parsek M.R. and Greenberg E.P. *Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms*. Trends in Microbiology, Vol.13, p.27-33, 2005.

12. Blackwell H.E. *Bacterial Crowd. Control with Iron*. Chemistry & Biology, Vol. 12, p. 721-723, 2005.

13. Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., and Caldwell, D.E. *Optical sectioning of microbial biofilms.* Journal of Bacteriology. Vol. 173, p.6558-6567, 1991.

14. Post J.C., Stoodley P., Hall-Stoodley L. and Ehrlich G.D. *The role of biofilms in otolaryngologic infections.* Current Opinion in Otolaryngology Head Neck Surg 12, p.185-190, 2004.

15. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P. and Welsh M.J. *A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development*, Nature Vol. 417, p. 552-555, 2002.

16. Thomas J.G. and Nakaishi, L.A. *Managing the complexity of a dynamic biofilm*, Journal of American Dental Association Vol.137, p.10-15, 2006.

17. Bordi C. and De Bentzmann S., *Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge*. Annals of Intensive Care, Vol. 1, p.1-8, 2011.

18. Li C. and Yu-mei W. *The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies*. International Journal of Oral Science. Vol. 3, p.66–73, 2011.

19. Atlas R.M and Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. Capítulo 3, p. 59-92. Pearson Educación S.A. Madrid, España, 2002.

20. Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S. and Song Z. *Current understanding of multi-species biofilms.* International Journal of Oral Science, Vol. 3, p. 74-81, 2011.

21. Loera Muro A., Ramírez Castillo F.Y., Avelar González F.J. and Guerrero Barrera A.L. *Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir.* Investigación y Ciencia, Vol. 20, p. 49-56, 2012.

22. Berry D., Xi Ch. and Raskin L *Microbial ecology of drinking water distribution systems.* Environmental biotechnology, Vol 17, p. 297–302, 2006.

23. Ludensky M., Control and monitoring of biofilms in industrial applications International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 51, p. 255 – 263, 2003.

24. http://www.clinicadentalquilez.com/images/Blog/Placa.jpg

25. http://orthoinfo.aaos.org/figures/A00682F03.jpg

26. http://descalcificador10.com/wp-content/uploads/2016/10/corrosion-en-tuberia-300x228.gif

27. http://www.emesa.com.mx/img/planta_tratamiento_render.png

28.https://static1.squarespace.com/static/521e95f4e4b01c5870ce81cf/t/56b510f5b654f9372fd420c4/1454706935222/Derrame-petrolero-en-Nueva-Zelanda-a-600x400.jpg

29. Wimpenny J., Manz W. and Szewzyk U., *Heterogeneity in biofilms*, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 24, p. 661–671, 2000.

30. Muyzer G. *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology, Vol. 2, p. 317-322, 1999.

31. Green S.J., Leigh M.B. and Neufed J.D. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. (In) Timmis K.N. (Ed) Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds. Springer (Heidelberg, Germany), p. 4137-4158, 2009.

32. Teng F., Guan Y.T. and Zhu W.P. *Effect of biofilm on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution system: Corrosion scales characterization and microbial community structure investigation*. Corrosion Science, Vol. 50, p. 2816–2823, 2008.

33. Rastelli S. E., Rosales B.M. and Viera M.R. *Biofilms in arsenic-containing water: bacterial community*. Journal of Water Supply: Research and Technology— AQUA, Vol. 65, p. 1-11, 2016.

34. Roeder R.S., Lenz J., Tarne P., Gebel J., Exner M. and Szewzyk U. *Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms.* International Journal of Hygiene and Environmental Health, Vol. 213, p. 183-189, 2010.

35. Amman R. and Fuchs B.M., *Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques.* Nature Reviews Microbiology, Vol. 6, p. 339–348, 2008.

36. Gamby J., Pailleret A., Boucher C.C., Pradier C.M. and Tribollet B. *In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods*. Electrochemical Acta, Vol. 54, p.66–73, 2008.

37. Walker J.T., Verran J., Boyd R.D., and Percival, S. *Microscopy methods to investigate structure of potable water biofilms.* Methods in Enzymology, Vol. 337, p. 243–255, 2001.

38. Stewart P.S., Murga R., Srinivasani R. and de Beer D. *Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods*. Water Research, Vol. 29, p. 2006-2009, 1995.

39. Beech I.B., Tapper R. and Gubner R., *Microscopy methods for studying biofilms*. In: Evan, L.V. (Ed.), Biofilms: Recent Advances for Their Study and Control. Harwood, London, pp. 51–70, 2000.

40. El Abed S., Ibnsouda S.K., Latrache H. and Hamadi F. *Scanning Electron Microscopy (SEM) and Environmental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation*. In: Kazmiruk V (ed) Scanning Electron Microscopy. DOI: 10.5772/34990, 2012.

41. Priester J.H., Horst, A.M., Van De Werfhors, L.C., Saleta J.L., Mertes L.A.K. and Holden P.A. *Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy.* Journal of Microbiological Methods, Vol. 68, p.577–587, 2007.

42. Little B., Wagner P., Ray R., Pope R. and Scheetz R. *Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation*. Journal of Industrial Microbiology, Vol. 8, p. 213–221, 1991.

43. Flores C.Y., Diaz C., Rubert A., Benítez G., Fernández Lorenzo M., Schilardi P., Vericat C., Salvarezza R. *Efecto de las nanopartículas de plata sobre la formación de biopelículas de Pseudomonas aeruginosa sobre superficies de titanio.* XVI Congreso Argentino de Fisicoquimica y Química Inorgánica, Salta, 18-21 de mayo de 2009.

44. Saa A. and Teschke O. *Extracellular polymeric bacterial coverages as minimal area surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 304, p. 554–557, 2006.

45. van der Aa B.C. and Dufrene Y.F. *In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Vol. 23, p.173–182, 2002.

46. Núñez M.E., Martin M.O., Chan P.H., Duong L.K., Sindhurakar A.R. and Spain E.M. *Atomic Force Microscopy of Bacterial Communities*. Methods in Enzimology. Vol. 397, p. 256-268, 2005.

47. Schilardi P., Diaz C., Flores C., Alvarez F., and Fernández Lorenzo de Mele M. *Atomic force microscopy and optical microscopy: suitable tools for the study of the initial stages of biofilm formation.* Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas Ed., p.860-869, 2010.

48. Wagner M., Ivlevab N.P., Haischb C., Niessnerb R. and Horna H. *Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix.* Water Research Vol. 43, p. 63–76, 2009.

49. Neu T.R., Manz B., Volke F., Dynes J.J., Hitchcock A.P. and Lawrence J.R. *Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems*. FEMS in Microbiology Ecology, Vol. 72, p.1-21, 2010.

50. Lewandowski Z. *Notes on biofilm porosity*. Water Research, Vol. 34, p. 2620-2624, 2000.

51. Pitts, B. and Stewart, P. *Confocal laser microscopy on biofilm: Successes and limitations*. Microscopy today, p. 18-22, 2008.

52. Rastelli, S.E., Rosales, B.M., Viera M.R. and Elsner, C.I. *Bacterial biofilms formed in arsenic-containing water: biodeterioration of water network materials.* Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA, Vol. 64, p. 738-748, 2015.

53. Gamby J., Pailleret A., Boucher C.C., Pradier C.M. and Tribollet B. In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods. Electrochemical Acta, Vol. 54, p.66–73, 2008.

54. Delatolla R., Tufenkji N., Comeau Y., Lamarre D., Gadbois A. and Berk D. *In situ characterization of nitrifying biofilm: Minimizing biomass loss and preserving perspective*. Water research, Vol. 43, p. 1775-1787, 2009.

55. Garny K., Neu T.R., Horn H., Volke F. and Manz B. *Combined application of 13C NMR spectroscopy and confocal laser scanningmicroscopy – Investigation on biofilm structure and physico-chemical properties.* Chemical Engineering Science, Vol. 65, p. 4691-4700, 2010.

56. Simões M., Simões L.C. and Vieira M.J. *A review of current and emergent biofilm control strategies*. LWT - Food Science and Technology, Vol. 43, p. 573–583, 2010.

57. Chmielewski R. A. N. and Frank J. F. *A predictive model for heat inactivation of Listeria monocytogenes biofilm on buna-N rubber.* LWT – Food Science and Technology, Vol. 39, p.11-19, 2006.

58. Florjaniˇc M. and Krist J. *Microbiological quality assurance of purified water by ozonization of storage and distribution system.* Drug Development and Industrial Pharmacy, Vol. 32, p. 1113-1121, 2006.

59. Florjaniˇc M. and Kristl J. *The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system*. International Journal of Pharmaceutics, Vol. 405, p. 16-22, 2011.

60. Griebe T., and Flemming H.C. *Biocide-free antifouling strategy to protect RO biofouling.* Desalination, Vol. 118, p. 153–156, 1998.

61. Ludensky M. *Control and monitoring of biofilms in industrial applications*. International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 51, p. 255-263, 2003.

62. Pereira A., Mendes J., Melo L. F. *Using nanovibrations to monitor biofouling*. Biotechnology and Bioengineering Vol.15, p. 1407–1415, 2008.

63. Pereira A., Mendes J., & Melo L. F. *Monitoring cleaning-in-place of shampoo films using nanovibration technology.* Sensors and Actuators B: Chemical Vol. 136, p. 376–382, 2009.

64. Mosteller T. M. and Bishop, J.R. *Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm*. Journal of Food Protection, Vol. 56, p.34-41, 1993.

65. Wirtanen G., Saarela M. and Mattila-Sandholm T. *Biofilms – impact on hygiene in food industries.* In J. D. Bryers (Ed.), Biofilms II: Process analysis and applications, p. 327-372, 2000.