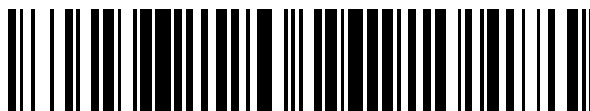


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 448**

51 Int. Cl.:

A61L 2/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2012** **PCT/US2012/021720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012** **WO12099959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2012** **E 12736242 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 2665496**

54 Título: **Esterilización con vapor de ácido peracético preferiblemente de recipientes para comida y bebida**

30 Prioridad:

20.01.2011 US 201161434515 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.05.2020

73 Titular/es:

PEROXYCHEM LLC (100.0%)
One Commerce Square, 2005 Market Street, Suite
3200
Philadelphia, PA 19103, US

72 Inventor/es:

ROVISON, JOHN, M., JR.;
LYMBURNER, CHARLES, J.;
ABRAHAM, SHIBU y
THOMPSON, ANGELA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 762 448 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Esterilización con vapor de ácido peracético preferiblemente de recipientes para comida y bebida

Campo de la invención

La presente invención está dirigida a un método de esterilización según la reivindicación 1.

5 Antecedentes de la invención

El uso de botellas de plástico compuestas de plásticos moldeables, como el poli(tereftalato de etileno) (PET), se ha extendido ampliamente durante las últimas décadas. Debido a que tales botellas de plástico son casi irrompibles, solamente pesan aproximadamente una décima parte del peso de cristal, tienen una excelente transparencia y no confieren ningún sabor a sus contenidos, tales botellas se han convertido en omnipresentes en la sociedad actual.

10 Como para todos los recipientes a rellenar asépticamente, las botellas de plástico deben ser esterilizadas funcionalmente para retirar trazas de contaminantes como bacterias (p.ej. *C. botulinum*) u hongos antes de rellenarlas con el fin de alcanzar requerimientos de almacenamiento asépticos y longevidad del relleno. Generalmente, los recipientes son producidos previamente y almacenados en grandes cantidades hasta que están listos para usarse y por lo tanto son proclives a la contaminación bajo condiciones normales de almacenamiento.

15 Algunos recipientes de plástico se almacenan como tubos o tacos de plástico, y se moldean por soplado con aire caliente antes de entrar en la máquina de rellenado; debido a la baja temperatura de fusión de la botella de plástico, la superficie interior no se esteriliza necesariamente durante esta etapa de moldeo por soplado y requiere un tratamiento adicional. Las botellas de plástico ofrecen un desafío único por no poder resistir los tratamientos más duros (tiempo y temperatura) que se pueden impartir a los recipientes de cristal o metal con el fin de conseguir la

20 esterilidad antes del rellenado. De acuerdo con esto, antes de que se puedan rellenar estas botellas con consumibles, es esencial que sean esterilizadas con el fin de asegurar que se minimice el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos. Debido a que gran número de tales botellas de plástico requerido para satisfacer la demanda de los consumidores, es deseable que tal esterilización sea llevada a cabo rápidamente sin ningún perjuicio en la eficacia.

25 Aunque el ácido peracético (que también se denomina ácido peroxiacético) "PAA" es un agente esterilizante conocido, la técnica anterior indica que las formulaciones acuosas de PAA no son adecuadas para la rápida esterilización de recipientes fabricados con PET. Así, la patente de EE.UU. 6 790 380 describe que con el fin de prevenir la formación de bacterias nocivas es necesario aumentar la temperatura o concentración de un agente esterilizante, o prolongar el tiempo de tratamiento. Sin embargo, tal publicación indica que ninguna de estas

30 opciones es deseable para la esterilización de PET usando PAA acuoso – calentar la disolución de PAA tiende a deformar las botellas de PET; mientras aumentar la concentración da como resultado de manera no deseable muchos residuos de peróxido de hidrógeno y/o ácido acético. No es deseable prolongar el tiempo de tratamiento lo que esto ralentizaría el procedimiento considerablemente.

35 Las patentes de EE.UU. 6 536 188 y 6 945 013 describen el uso de nieblas de peróxido de hidrógeno para desinfectar el interior de botellas de PET. Estas publicaciones indican además que también puede emplearse el oxonia (una mezcla que comprende 15-40 por ciento en peso de peróxido de hidrógeno; 7-13 por ciento en peso de ácido acético; y 5-10 por ciento en peso de PAA). Sin embargo, estas publicaciones indican además que es necesario activar primero tal esterilizante y luego retirarlo usando una variedad de estaciones de secado.

40 La solicitud de patente de EE.UU. 2010/0196197 describe el uso de un vapor real (en lugar de una niebla que contiene partículas suspendidas de líquido) de una disolución diluida de PAA para esterilizar superficies. Sin embargo, tal publicación indica que tal vapor debería emplearse a una temperatura de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 120 grados C, y durante un tiempo de contacto de entre aproximadamente 15 y 40 minutos. Cabe señalar que la temperatura de transición vítrea del PET es aproximadamente 75 grados C, y que por lo tanto las botellas de PET pueden deformarse a temperaturas mayores. Además, tal tiempo de contacto extendido no es

45 responsable de la rápida esterilización de un gran número de botellas.

De acuerdo con esto, sería deseable poder desarrollar un método para esterilizar rápidamente botellas de PET empleando PAA como el esterilizante.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a un método de esterilización según la reivindicación 1.

50 Tal método se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de un iniciador de peróxido de hidrógeno y es particularmente adecuado para la esterilización de botellas de poli(tereftalato de etileno).

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a un método de esterilización según la reivindicación 1.

Tal como se usa en este texto, el término vapor significa un estado en el que el ácido peracético está de manera

sustancial enteramente en forma gaseosa. Esto es en contraste con bruma o niebla, que contienen ambos dos una proporción significativa de gotas de líquido suspendidas en el aire.

El ácido peracético se emplea típicamente en forma de una mezcla acuosa en equilibrio de ácido acético, peróxido de hidrógeno y ácido peracético, donde la relación en peso de tales componentes es aproximadamente 35:10:15.

5 Típicamente, tal composición puede comprender además estabilizantes como ácidos fosfónicos o fosfonatos, es decir Dequest® 2010 o secuestrantes como ácido dipicolínico, al igual que otros ingredientes como: catalizadores de ácidos minerales (ácidos sulfúrico, nítrico, o fosfórico); tensioactivos como laurilatos aniónicos, sorbitanos y sus respectivos ésteres, es decir sorbitán monolaurilatos de polietileno; y ésteres de ácidos grasos de cadena corta (C₃-C₁₂) que forman mezclas de perácidos en disolución.

10 Preferiblemente, el método de esta invención se lleva a cabo en ausencia de un activador de peróxido de hidrógeno (como luz ultravioleta) ya que se ha descubierto inesperadamente que la actividad del PAA en fase vapor se reduce cuando se emplea tal activador.

15 Antes de su introducción en la corriente de gas caliente, el ácido peroxiacético se diluye preferiblemente, mediante la adición de agua, hasta una concentración de al menos aproximadamente 3500 partes por millón (ppm). Aunque se pueden emplear concentraciones más altas, se prefiere que el PAA tenga una concentración por debajo de aproximadamente 10000 ppm, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 8000 ppm con el fin de reducir la cantidad de residuo de peróxido o de acético que puede permanecer sobre la superficie tratada. Más preferiblemente, el PAA se diluye hasta una concentración entre aproximadamente 3750 y 4250 ppm.

20 La corriente de gas caliente es típicamente aire estéril, aunque también se pueden emplear otros gases como nitrógeno, CO₂, o transportadores de gases nobles inertes. Tal corriente de gas se calienta típicamente hasta una temperatura de al menos aproximadamente 300°C, preferiblemente hasta una temperatura mínima de aproximadamente 250°C y puede estar por encima de 350°C siempre que pueda enfriarse suficientemente para su aplicación. El aire caliente se enfría hasta la temperatura deseada mediante la adición y expansión de la disolución esterilizante a temperatura ambiente. Con el fin de asegurar que el ácido peracético se emplea en forma de vapor, la disolución de PAA se añade a la corriente de gas caliente en una relación que asegura que la corriente está por debajo del 100% saturada. Preferiblemente, el PAA se añade en una proporción tal que la corriente de gas caliente está saturada entre aproximadamente 75% y aproximadamente 85%. Una saturación de aproximadamente 80% puede conseguirse al añadir la disolución de PAA en una proporción de aproximadamente 5 ml/min (correspondiente a aproximadamente una gota por segundo) a una corriente de gas caliente que tiene un flujo de aire de aproximadamente 30 litros/minuto.

30 La temperatura de la corriente de PAA en fase de vapor se reduce hasta entre 57°C y 75°C; luego la corriente de gas se pone en contacto con el material a esterilizar durante un periodo de tiempo suficiente para matar los contaminantes en cuestión. Este periodo de tiempo variará según variables como la concentración del vapor de ácido peracético empleado; la naturaleza de la superficie del material a esterilizar; los contaminantes particulares es esterilizar; la concentración de los contaminantes a esterilizar; y similares. Sin embargo, se ha descubierto que tiempos de contacto que no superan 5 segundos son suficientes para esterilizar eficazmente las superficies para ensayo.

35 El procedimiento de la presente invención es adecuado particularmente para la esterilización de botellas y otros recipientes fabricados con PET. Sin embargo, se pueden esterilizar una gran variedad de otros materiales, incluidos metales, cristal, plásticos, polímeros y elastómeros empleando el método de esta invención.

40 El presente método puede usarse para esterilizar materiales contaminados con aquellas bacterias controladas típicamente por el ácido peracético en la forma líquida. Estas incluyen bacterias y esporas del género *Bacillus* usando *B. thuringiensis* y *B. atrophaeus* como sustitutos para especies más patogénicas (formas) como *C. botulinum* al igual que más géneros típicos de bacterias, hongos, y virus y protozoos controlados a menudo por el PAA como (sin ser limitantes): *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Rhizopus*, *Mucor*, Influenza y similares.

Los ejemplos siguientes se presentan para ofrecer mayor ilustración del método de esta invención, pero no pretenden limitar el alcance de la invención se ninguna manera.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Construcción del equipo de vaporización

55 Con el fin de preparar el esterilizante vaporizado a varias temperaturas y concentraciones, se construyó el siguiente equipo de vaporización. Se conectó un tubo de acero inoxidable de 1,27 cm (1/2 pulgada) de diámetro a una fuente de aire comprimido de 7,9 bares (100 psig). El tubo se conectó a una válvula de aguja de acero inoxidable (para ajustar el flujo de aire) que se conectó a un medidor de flujo de aire con rotámetro de tubo de cristal de la serie King Model 7910 (0-40 litros estándar por minuto). El medidor de flujo de aire se conectó a un calentador eléctrico que

tenía la capacidad de calentar el aire hasta 149°C (300 grados F) (bien por encima del punto de ebullición de la disolución de ácido peracético) que se conectó a una caja de vaporización. Esto es una caja de acero inoxidable que tiene una ventana de cristal en la parte superior para la observación de la entrada y vaporización de la disolución de ácido peracético. La caja de vaporización se aisló por 5 lados para minimizar la pérdida de calor. El fondo de la caja de vaporización se situó sobre una placa calefactora de laboratorio de Biomega Research Products capaz de calentar el fondo de la caja bien por encima del punto de ebullición de una disolución de PAA.

Se usó otra rama de un tubo de aire de acero inoxidable de 1,27 cm (1/2 pulgada) para presurizar un cilindro calibrado que contenía las diferentes disoluciones acuosas de PAA y otros esterilizantes para ensayar en el equipo. El cilindro calibrado se conectó a un tubo de acero inoxidable de 0,63 cm (1/4 de pulgada) que tenía una válvula de aguja para controlar el flujo de la disolución a través del tubo. Este tubo se conectó a la parte superior de la caja de vaporización de modo que las gotas de la disolución esterilizante que salía del tubo cayeran directamente al fondo caliente de la caja de vaporización, permitiendo una entrada suficiente de calor de modo que la disolución se vaporizara en la corriente de aire caliente. Un tubo de acero inoxidable aislado de 1,27 cm (1/2 pulgada) que tenía un cable termopar de platino insertado en él (usado para medir y controlar la temperatura de la corriente de vapor caliente) servía como una salida para la corriente de esterilizante vaporizado en el equipo para ensayo.

Durante el ensayo descrito a continuación, el flujo de aire del aire caliente se ajustó a 30 litros/minuto ajustando el rotámetro de King; y la válvula de aguja se ajustó para proporcionar la disolución para ensayo a una proporción de 5 mL/minuto (aproximadamente 1 gota/segundo); produciendo una corriente de vapor caliente que estaba saturada aproximadamente al 80%. La temperatura del calentador eléctrico se ajustó para calentar el aire hasta 149°C (300 grados F); y la temperatura de la placa calefactora se ajustó hasta que la corriente de vapor saliente adquiriera la temperatura deseada indicada.

La potencia de las mezclas diluidas de PAA/agua empleadas se midió usando un equipo 814 USB Sample Processor de Metrohm que emplea una evaluación potenciométrica de los puntos de inflexión del pH se usó para determinar el contenido de PAA de la disolución constituida.

Ensayos de PAA en fase vapor en recipientes para esterilizar

La evaluación de la eficacia del vapor de ácido peracético a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 5 y 10 segundos frente a *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 en botellas para bebidas.

El equipo de vaporización descrito anteriormente se usó para evaluar la eficacia del vapor de ácido peracético (PAA) frente a esporas de *B. atrophaeus* ATCC 9372, una bacteria que forma endoesporas usada habitualmente como organismo para ensayos de esterilización en ensayos de validación del procesamiento de bebidas. La superficie del fondo de las botellas de agua de PET se inoculó con una suspensión preparada de esporas de *B. atrophaeus* con un objetivo de 10^5 esporas por botella. Las botellas inoculadas y secas se expusieron al vapor de una disolución de diferentes concentraciones de PAA producida mediante la dilución apropiada de ácido peracético Clarity® (disponible en FMC Corporation) a aproximadamente 60°C, durante 5 y 10 segundos de exposición; con y sin un tratamiento de cinco segundos con luz ultravioleta (un activador de peróxido de hidrógeno) en el punto de suministro de vapor. Las botellas se enumeraron y se pusieron sobre una placa para el recuento aeróbico en placa ("APC" por sus siglas en inglés), y el caldo restante se incubó para la confirmación del crecimiento, tal como se detalla a continuación.

Preparación del inóculo

Se adquirió una suspensión preparada de esporas de *B. atrophaeus* 9372 de Presque Isle Cultures. La disolución contenía 40% de etanol, y se almacenó en la nevera de laboratorio hasta el momento del ensayo. La suspensión contenía 1.3×10^{10} colonias que formaban unidades de esporas (CFU)/mL. Se preparó una dilución al 40% de etanol por cada ensayo; los ensayos a 4300 ppm de PAA contenían aproximadamente 1×10^6 esporas/mL (objetivo de 1×10^4 esporas/botella); y los ensayos a 2014 ppm y 7947 ppm contenían aproximadamente 1×10^7 esporas/mL (objetivo de 1×10^5 esporas/botella); para servir como inóculo en los ensayos.

Preparación del vehículo para las botellas

Las botellas de agua de PET disponibles comercialmente (0,5 L) se rellenaron y se enjuagaron con etanol absoluto, y se dejaron secar durante toda la noche en una cabina de seguridad biológica, con el fin de desinfectar la superficie interna. Las botellas se inocularon luego con 10 µL del inóculo apropiado sobre la superficie interna del fondo con el cultivo de trabajo. Luego, se dejaron secar toda la noche en una cabina de seguridad biológica hasta su secado. Las botellas inoculadas se usaron para ensayar a la semana de preparación.

Método de ensayo

Las botellas inoculadas se situaron al final del tubo de suministro de vapor en una campana extractora localizada adyacente al equipo de vaporización, y se sometió al vapor durante aproximadamente 5 y 10 segundos de exposición, medido con un reloj de laboratorio.

Inmediatamente después de retirarlas del tubo de suministro de vapor, se añadieron 50 mL de un caldo neutralizante que comprendía Lethen más 0,5% de tiosulfato de sodio a la botella usando una técnica aséptica. Las botellas se cerraron y se agitaron para asegurar que cualquier vapor que hubiera condensado sobre los lados se mezclara con el neutralizante. Las botellas se sonicaron luego durante 5 minutos, y se mezclaron por agitación durante 30 segundos, seguido de dilución en un tampón Butterfield y se pusieron en placas para APC. Todas las botellas del ensayo con caldo neutralizante, y todas las placas, se incubaron a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 24 horas, antes de la lectura preliminar, y se incubaron adicionalmente durante varios días a 2 semanas para las lecturas finales. El ensayo se llevó a cabo una vez. Los controles del inóculo se llevaron a cabo por duplicado enumerando las botellas inoculadas y no tratadas tal como se ha descrito anteriormente. A la finalización de la incubación, se evaluó el crecimiento en las botellas por la turbidez. Los resultados de tal ensayo se resumen en las tablas 1 y 2 a continuación:

Tabla 1

Resultados del ensayo de vapor usando una disolución de PAA de aproximadamente 4000 ppm

Conc. de PAA en el cilindro	Tiempo (s)	UV	Crecimiento en la botellas	CFU restantes
4300 ppm*	5 s	Sin	No	< 50
	10 s		No	< 50
	5 s	Con	Si	< 50
	10 s		Si	< 50
NA (controles de población)	5 s	NA	Si	$2,25 \times 10^4$
	10 s		Si	$8,5 \times 10^3$

* determinado usando el valorador automático

Tabla 2

Resultados del ensayo de vapor usando como objetivo una disolución de PAA de 2000 ppm y 8000 ppm

PAA en el cilindro (ppm)*	Tiempo (s)	UV	Crecimiento en la botellas	CFU restantes
2014 ppm PAA	5 s	Sin	Si	$3,1 \times 10^4$
	5 s		Si	$5,75 \times 10^3$
	10 s		Si	$3,0 \times 10^4$
	5 s	Con	Si	$6,45 \times 10^4$
	5 s		Si	$2,95 \times 10^4$
	10 s		Si	$2,2 \times 10^3$
7947 ppm PAA	5 s	Sin	No	< 50
	10 s		No	< 50
	5 s	Con	Si	~ 50**
	10 s***		No	< 50
NA (controles de población)	5 s	NA	Si	$2,9 \times 10^5$
	10 s		Si	$1,455 \times 10^5$

* Determinado usando el valorador automático

**Un resultado de 1 CFU conseguido a partir de 50 mL, luego aproximadamente 50 CFU restante

***Esta muestra se ensayó durante 5 segundos, luego otros 5 segundos inmediatamente después

Los resultados anteriores demuestran que la esterilización sustancialmente completa se observó con el uso de PAA en concentraciones de al menos 4300 ppm en ausencia de luz ultravioleta. Estos resultados han revelado sorprendentemente que la luz UV es un conocido activador de peróxido de hidrógeno.

Ejemplo 2

Ensayo residual

Empleando el equipo de vaporización descrito en el Ejemplo 1, los ensayos se realizaron con el fin de determinar la cantidad de peróxido de hidrógeno residual depositado sobre las superficies de las botellas esterilizadas. Las botellas de PET (0.5 L) se rellenaron y se enjuagaron tres veces con agua desionizada, luego se sometieron al vapor de PAA a concentraciones de aproximadamente 4000 y 14000 ppm durante 5 segundos. Después de tal tratamiento,

las botellas se rellenaron con agua desionizada; y el agua se ensayó para niveles bajos de peróxido de hidrógeno usando un kit de valoración LaMotte HP-40. También se llevó a cabo un ensayo de la cantidad de PAA suministrado en el vapor. Para este propósito, las tiras de prueba de PAA High Range se mojaron previamente con agua desionizada y se situaron en botellas representativas uni-inoculadas. Las botellas se sometieron al vapor, y se evaluó la tira para prueba por el cambio de color para indicar la presencia de PAA en el vapor. Los resultados de tal ensayo se resumen en las tablas 3 y 4 a continuación:

Tabla 3

Resultados del ensayo de peróxido de hidrógeno residual usando botellas de 0.5 L, exposición de 5 segundos

Ensayo	Concentración de la disolución de PAA (ppm)		Concentración residual después del tratamiento con PAA en vapor
	Diana	Actual *	
LaMotte HP-40	4000	3943	0,3 a 0,4 ppm
	14000	13973	2,0 ppm

* medido usando valorador automático

Tabla 4

Concentración de vapor de PAA usando botellas de 0.5 L, exposición de 5 segundos

Ensayo	Concentración de la disolución de PAA (ppm)		Concentración aplicada en el vapor, usando la tira para ensayo para una aproximación
	Diana	Actual *	
Tiras del ensayo de PAA	4000	3943	Aproximadamente 250 ppm
	14000	13973	≥ 1000 ppm (max, tira para ensayo)

Los resultados anteriores indican que el procedimiento de esta invención puede esterilizar eficazmente botellas de PET sin dejar cantidades excesivas de peróxido de hidrógeno residual.

Ejemplo 3

Evaluación del control de *Bacillus subtilis* a concentraciones de 2000, 3000 y 4000 ppm de PAA en fase de vapor

Empleando el equipo y el procedimiento descrito en el ejemplo 1, se prepararon disoluciones vaporizadas de PAA que tenían concentraciones de 2000 ppm, 3000 ppm y 4000 ppm de PAA mediante la dilución de ácido peracético Clarity® con agua desionizada tal como se describe a continuación. Tal ensayo implicaba el tratamiento de las botellas inoculadas con el PAA vaporizado a aproximadamente 60°C durante 5 segundos de exposición, con y sin tratamiento de luz UV durante 5 segundos.

Preparación del inóculo

Se adquirió una suspensión preparada de esporas de *B. subtilis* 19659 de Presque Isle Cultures. La disolución contenía etanol al 40%, y se almacenó en la nevera hasta el momento del ensayo. La suspensión contenía 1.6×10^{10} CFU/mL de esporas. Se preparó una dilución en etanol al 40% para estos ensayos, para obtener aproximadamente de 1×10^8 esporas/mL (diana de 1×10^6 esporas/botella) para servir como los inóculos de los ensayos.

Preparación del vehículo para las botellas

Las botellas de agua de PET disponibles comercialmente (0,5 L) se rellenaron y se inocularon con 10 µL del inóculo apropiado sobre la superficie interna del fondo con el cultivo de trabajo. Luego, se dejaron secar durante toda la noche.

Preparación biocida

Se valoró el ácido peracético Clarity® (disponible en FMC Corporation) usando un valorador automático para determinar la concentración de partida, que se usó para determinar y preparar las diluciones necesarias para las disoluciones de PAA en agua desionizada. Las alícuotas biocidas se prepararon usando 11,85 g de ácido peracético Clarity® en 1 L de agua para obtener una disolución de 2000 ppm; 17,77 g de ácido peracético Clarity® en 1 L de agua desionizada para obtener una disolución de 3000 ppm y 23,70 g de ácido peracético Clarity® en 1 L de agua desionizada para preparar una disolución de 4000 ppm. Se reservó una pequeña cantidad de cada disolución para su valoración con el valorador automático, y el resto se añadió al cilindro del equipo de vapor. Los resultados de tal valoración se muestran en la tabla 5:

Tabla 5
Resultados de la valoración

Concentración objetivo	Resultados del valorador automático (ppm)	Temperatura del ensayo
2000 ppm	2053,67	58-60°C
3000 ppm	3048,96	59,5°C
2000 ppm	2080,69	56,0°C
3000 ppm	3089,93	58,0°C
4000 ppm	4204,76	57,0°C

* La concentración de partida de PAA era 16.8808%

Método del ensayo

- 5 Empleando el equipo y procedimiento descritos en el Ejemplo 1, las botellas inoculadas se trataron con la disolución de PAA vaporizado. Inmediatamente después de la retirada del tubo de suministro de vapor, las botellas se mantuvieron 5 segundos, o se trataron con luz UV durante 5 segundos. Inmediatamente después de esta etapa, se añadieron 50 mL de un caldo neutralizante Letheen más 0,5% de tiosulfato de sodio a la botella usando una técnica aséptica. Las botellas se cerraron y se agitaron para asegurar que el vapor que hubiera condensado sobre los lados se mezclara con el neutralizante. Las botellas se sonicaron luego durante 5 minutos, y se mezclaron por agitación durante 30 segundos, seguido de dilución en un tampón Butterfield y se pusieron en placas para APC. Todas las botellas del ensayo con caldo neutralizante, y todas las placas, se incubaron a 35±2°C durante aproximadamente 24 horas a 72 horas, antes de la lectura preliminar, y se incubaron adicionalmente durante varios días a 2 semanas para las lecturas finales. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado. Los controles del inóculo se llevaron a cabo por duplicado también, enumerando las botellas inoculadas y no tratadas tal como se ha descrito anteriormente. A la finalización de la incubación, se evaluó el crecimiento en las botellas por la turbidez.

Cálculos

$\text{Log}_{10} \text{ Reducción} = \text{Media } \text{log}_{10} (\text{población control}) - \text{log}_{10} (\text{muestra para ensayo})$

Los resultados de tal ensayo se muestran en la tabla 6 a continuación.

20 Tabla 6

Resultados del ensayo de vapor con disoluciones de PAA de 2000, 3000, y 4000 ppm con y sin tratamiento posterior con UV vs. esporas de *B. subtilis*

PAA en el cilindro	Tratamiento UV	Crecimiento en la botella	Log ₁₀ CFU	Media Log ₁₀ CFU	Log ₁₀ Reducción
2000 ppm	Si	Neg.	5,08	5,13	1,23
		+	5,18		
	No	+	5,45	5,51	0,85
		+	5,57		
3000 ppm	Si	Neg.	4,24	4,53	1,82
		Neg.	4,83		
	No	Neg.	4,92	5,12	1,23
		+	5,32		
4000 ppm	Si	Neg.	4,15	2,07	4,28
		Neg.	0,00		
	No	Neg.	0,00	0,00	6,35
		Neg.	0,00		
NA (pob.control)	No	+	7,03	6,35	NA
		+	5,68		

- 25 Los resultados anteriores indican que se observó el control completo cuando se empleó vapor de PAA que tenía una concentración de 4000 ppm en ausencia de luz UV. Se observó un control sustancialmente más pobre por tratamiento con concentraciones inferiores de PAA.

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia de vapor de peróxido de hidrógeno al 35% comparado con PAA a 4000 ppm a aproximadamente 50, 55 y 60°C frente a *Bacillus subtilis* ATCC 19659 en botellas para bebida tratadas durante 5 segundos

- 5 Empleando el equipo y procedimiento descritos en el Ejemplo 1 (excepto que se señale lo contrario), se usaron esporas de *B. subtilis* 19659 para evaluar la eficacia del peróxido de hidrógeno concentrado (aproximadamente 35%) en fase vapor comparado con ácido peracético (PAA) de 4000 ppm en fase vapor en botellas de PET para bebidas a 50, 55 y 60°C durante 5 segundos de exposición.

Preparación del inóculo

- 10 Se adquirió una suspensión preparada de esporas de *B. subtilis* 19659 de Presque Isle Cultures. La disolución contenía etanol al 40%, y comprendía 1.6×10^{10} CFU/mL de esporas. Se preparó una dilución 1:100 en etanol al 40% con el fin de obtener aproximadamente 1×10^8 esporas/mL, para servir como los inóculos de trabajo en este ejemplo.

Preparación del vehículo para las botellas

- 15 En este ensayo, se usaron botellas PET para bebidas disponibles comercialmente (0.5 L). Las botellas se inocularon con 10 µL del inóculo de esporas sobre la superficie interna del fondo con el cultivo de trabajo para obtener 1.6×10^6 esporas/botella. Luego, se dejaron secar durante toda la noche en una cabina de seguridad biológica. Se observó si las botellas estaban secas antes del ensayo.

Preparación biocida

- 20 Se valoró el ácido peracético VigorOx® SP-15 (disponible en FMC Corporation) usando el valorador automático para determinar que la concentración de partida era de 15.2929%, que se usó para determinar y preparar las diluciones necesarias para una disolución de PAA de 4000 ppm en agua desionizada. Como comparación, se empleó una botella muestra de peróxido de hidrógeno Durox® (que comprendía peróxido de hidrógeno al 35.7%; disponible en FMC Corporation).

- 25 Método del ensayo

Empleando el equipo de vaporización descrito en el ejemplo 1, se prepararon las formulaciones que tenían las temperaturas indicadas. Las botellas inoculadas se situaron en el final del tubo de suministro de vapor, y se sometieron al vapor durante 5 segundos de exposición, medido con un reloj de laboratorio. Inmediatamente después de retirarlas del tubo de suministro de vapor, se añadieron 50 mL de un caldo neutralizante Letheen más 0.5% de tiosulfato de sodio a la botella usando una técnica aséptica. Luego se añadió una alícuota de 100 µL de catalasa (Worthington Biomedicals, 85583 unidades por mgP, y 0.48 mgP/mL) a cada botella para neutralizar cualquier peróxido de hidrógeno restante. Las botellas se cerraron y se agitaron para asegurar que cualquier vapor que hubiera condensado sobre los lados se mezclara con el neutralizante. Las botellas se sonicaron durante 5 minutos, seguidamente se mezclaron por agitación durante 30 segundos, luego se diluyeron en un tampón Butterfield y se pusieron en placas Petrifilm para APC. Todas las botellas con caldo neutralizante, y todas las placas, se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 72 horas, antes de retirarlas del incubador para permanecer a temperatura ambiente durante unas 24 horas adicionales antes del recuento. El ensayo se llevó a cabo por duplicado. Los controles de los inóculos se llevaron a cabo por duplicado también, enumerando las botellas inoculadas y no tratadas tal como se ha descrito anteriormente.

- 40 Cálculos

$\text{Log}_{10} \text{ Reducción} = \text{Media log}_{10} (\text{población control}) - \text{log}_{10} (\text{muestra para ensayo})$

Los resultados de tal ensayo se resumen en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Peróxido de hidrógeno en fase de vapor y PAA de 4000 ppm vs. botellas con 6.2 log₁₀ de esporas *B. subtilis*

Producto	Temperatura	CFU/mL	log ₁₀ CFU/mL	Media log ₁₀	Media log ₁₀ Reducción
PAA de 4000 ppm	50°C	23500	4,37	4,82	1,38
		190000	5,28		
Peróxido de hidrógeno		900000	5,95	5,86	0,35
		570000	5,76		
PAA de 4000 ppm	55°C	64000	4,81	4,47	1,73
		13500	4,13		
Peróxido de hidrógeno		1400000	6,15	6,09	0,11
		1100000	6,04		
PAA de 4000 ppm	60°C	0	0,00	0,00	6,20
		0	0,00		
Peróxido de hidrógeno		150000	5,18	5,18	1,03
		150000	5,18		
Controles de población	T. A.	1450000	6,16	6,20	NA
		1750000	6,24		

5 Los resultados anteriores indican que el procedimiento de la presente invención proporcionará una esterilización sustancialmente completa de las botellas de PET; y que el uso de peróxido de hidrógeno a tales temperaturas es relativamente ineficaz.

REIVINDICACIONES

1. Un método para esterilizar una superficie, que comprende las etapas de:
 - (a) añadir una disolución de ácido peracético a una concentración de entre 3500 mg/kg y 10000 mg/kg a una corriente de gas caliente para formar una corriente de ácido peracético en fase de vapor; y
 - (b) tratar tal superficie con la corriente de ácido peracético en fase de vapor, donde el ácido peracético está en la forma de gas entre 57° y 75°C,
5. caracterizado por que en la etapa (b) la superficie se trata durante 5 a 10 segundos, y por que la saturación del vapor es menos de 85%.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha superficie está compuesta por plástico.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha superficie es poli(tereftalato de etileno).
4. El método de la reivindicación 1, en donde tal tratamiento se lleva a cabo en ausencia de un iniciador de peróxido de hidrógeno.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de ácido peracético es al menos 3750 mg/kg.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración de ácido peracético está entre 3750 y 4250 mg/kg.
- 15 7. El método de la reivindicación 1, en donde la saturación del vapor está entre 75% y 85%.