INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE RADIOATIVA PRESENTE NO GERADOR
DE $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ NA ESTERILIDADE DO PRODUTO TERMINADO**

NEUZA TAEKO OKASAKI FUKUMORI

**Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientador:

Prof. Dr. João Alberto Osso Junior

Coorientadora:

Profa. Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

**São Paulo
2015**

Dedico este trabalho a Deus
A quem devo a minha existência,
Que me sustentou e me guardou até o dia de hoje,
E estará comigo por toda a eternidade.
A Ele toda a honra e toda a glória. Amém!

AGRADECIMENTOS

À minha família: David, Olivia e Vincent, pelo amor, pela paciência e pelo apoio que foram fundamentais para que eu concluísse esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, Josio (*in memoriam*) e Kiyoe que educaram, transmitiram experiências sábias e perseveraram com a confiança e a certeza de um bom futuro para os seus seis filhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Alberto Osso Junior, pelos seus ensinamentos, pela amizade e consideração, pelo seu jeito simples de ser, pela sua sinceridade e pelo incentivo no decorrer deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Margareth Mie Nakamura Matsuda, pelos ensinamentos e conselhos tão valiosos e por partilhar comigo as lutas e conquistas do dia a dia do Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia.

Ao Diretor da Diretoria de Produtos e Serviços e Gerente do Centro de Radiofarmácia, MSc. Jair Mengatti, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, Diretor de Administração e Infraestrutura do *ipen*, pelo apoio e incentivo no desenvolvimento da parte experimental.

À Profa. Dra. Margarida Mizue Hamada, Gerente do Centro de Tecnologia das Radiações, pelo apoio e pela amizade de longa data.

Ao inestimável e importante auxílio e apoio dos colegas do Centro de Tecnologia das Radiações: Dra. Luci Diva Brocardo Machado, responsável pelo Laboratório de Análise Térmica, pelas análises de Teflon[®]; Eng. José Mauro Vieira e Dr. Cyro Teiti Enokihara, pelos artigos e livros; Dr. Pablo Antonio Vasquez Salvador, responsável pelo Irradiador Multipropósito de ⁶⁰Co e Paulo de Souza Santos pelas irradiações dos materiais necessários aos experimentos.

Ao Dr. Luis Antonio Genova, do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais, pela análise das amostras de alumina.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, diretora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelos sábios conselhos que agregaram importantes conhecimentos ao trabalho.

Ao Antonio Luiz Marques Filho e à Natalia Baratelli Marques Uliani da empresa Forthmed pela presteza em atender aos pedidos de fornecimento de colunas de vidro com alumina para gerador.

Aos servidores do Centro de Radiofarmácia: Wagner Nieto pelo projeto para confecção de suportes de aço inoxidável para placas de Petri e montagem de um sistema prático para eluição das colunas, Luís Seiti Miyashiro pela disposição em ajudar sempre, Geraldo Alves Pereira e MSc. Luís Alberto Pereira Dias pelo carregamento de colunas com ⁹⁹Mo e montagem de geradores.

Ao MSc. Peterson Lima Squair pela amizade e pela contribuição em uma área tão complexa para mim: a dosimetria e os cálculos dosimétricos.

Um agradecimento muito especial ao Farm. Carlos Farias Felgueiras pela ajuda tão valiosa sem a qual grande parte do trabalho experimental não teria sido realizada.

À querida Erica Mitie de Moura Endo pelo tempo e trabalho dedicados. Desejo muito sucesso em sua formação e carreira profissional!

Ao Farm. Marcelo Pucci, à MSc. Stella Benedetti, ao José Luiz e à Vivian pela contribuição ímpar na execução de alguns experimentos.

Aos meus queridos cooperadores: Ademar Cerqueira Filho, Antonio Carlos Freire, Antonio Carlos Gomes, Claudia Regina Pereira Vicentin, Domingos Gomes de Campos, Eduardo de Campos Bueno, Ideli Moraes de Oliveira Estrela, Irene Vicente, José Alcides Silva Lima, José Luiz da Silva, Laercio da Silva, Jurandir Alves de Sousa, Ligia Benito da Silva Ricco, Mario Figueiredo Eusébio, Natanael Gomes da Silva, Patricia de Andrade Martins, Vivian Mendonça e Waldir Mauch de Carvalho, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

À Equipe de Proteção Radiológica do Centro de Radiofarmácia, em especial ao Evandro e Eduardo, pela orientação no manuseio de fontes radioativas e acompanhamento nos diversos experimentos.

Ao Farm. Leandro Brito pelo precioso auxílio na esterilização por calor úmido de diversos materiais.

À Fatima das Neves Gilli, à Neli Pires da Silva e ao Eli Soares, que têm inestimável valor no Centro de Radiofarmácia. Agradeço de coração o apoio e incentivo!

À Gerência da Garantia da Qualidade pela colaboração nos relatórios dos processos de esterilização por radiação gama.

Aos colegas Carlos Leonel Zapparoli Junior e Paulo Sérgio G. Meneghetti por terem possibilitado a compra de microrganismos, materiais e meios de cultura para o desenvolvimento deste trabalho.

Às pessoas muito especiais que fazem parte do grupo dos alunos do João: Graciela, Daphne, Tania, Renata, Marcela, Janio, Larissa, Carla e Katia, pela amizade sincera e pelo apoio.

À Dra. Nilda Petrona Sosa de Pereira e à Dra. Constancia Pagano Gonçalves da Silva, grandes incentivadoras e sob cujos cuidados iniciei as atividades na Radiofarmácia.

À MSc. Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza pela amizade e por transmitir experiências tão ricas na área de radiofarmácia.

Aos funcionários da pós-graduação, com destaque para Ana Claudia Martinelli Feher, da biblioteca, do setor de informática, da administração, da gráfica, da manutenção, da oficina e da segurança física.

À Profa. Dra. Mitiko Saiki, coordenadora de área da disciplina Tópicos Especiais em Tecnologia Nuclear – Aplicações II, pelo incentivo e pelos comentários e sugestões que enriqueceram o trabalho.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e à Comissão Nacional de Energia Nuclear pela formação pessoal e capacitação profissional.

A todos os que colaboraram direta ou indiretamente neste trabalho, anônimos ou conhecidos, minha sincera gratidão.

“Com a sabedoria edifica-se a casa, e com a inteligência ela se firma; pelo conhecimento se encherão as câmaras de toda sorte de bens, preciosos e deleitáveis.”

Provérbios 24, versículos 3 e 4.

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE RADIOATIVA PRESENTE NO GERADOR DE $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ NA ESTERILIDADE DO PRODUTO TERMINADO

Neuza Taeko Okasaki Fukumori

RESUMO

No processo de fabricação do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é fundamental, não só evitar a introdução de contaminantes microbianos, como também avaliar o efeito que a atividade radioativa pode provocar em microrganismos. Os objetivos deste trabalho foram: estudar os processos de esterilização por radiação gama (^{60}Co) dos acessórios e da coluna de alumina (Al_2O_3) que compõem o sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, e avaliar a eficácia da radiação gama na morte de microrganismos em geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ na mínima (9,25 GBq) e na máxima (74 GBq) atividade radioativa. Acessórios do gerador foram irradiados com doses absorvidas de 15, 25 e 50 kGy e as colunas de alumina com 10, 15, 25 e 50 kGy. A alumina das colunas irradiadas foi avaliada por análise combinada de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise elementar por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), e difração de raios X. O Teflon[®] foi avaliado por termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Cálculos dosimétricos foram realizados para o alvo de maior dose na coluna do gerador de 9,25 GBq e 74 GBq. Suspensões quantificadas de *B. subtilis* e esporos de *B. pumilus* foram inoculadas em colunas irradiadas a 25 kGy e observou-se que a coluna de alumina representou uma barreira física para a contaminação do eluato, pois a recuperação microbiana foi reduzida. Verificou-se que o *B. subtilis* na forma vegetativa mostrou menor afinidade pela alumina em relação aos esporos de *B. pumilus*. A recuperação microbiana foi menor no gerador com atividade radioativa em relação ao gerador sem radioatividade. Foi desenvolvido um indicador biológico de esporos de *B. pumilus* que consistiu em uma tira de alumínio com sílica gel colocado externamente à coluna e as quantidades recuperadas tanto no gerador de 9,25 GBq quanto no de 74 GBq mostraram redução na viabilidade. O uso de filtros Sep-Pak[®] e 0,22 μm no sistema do gerador mostrou eficiência na retenção de $4,9 \times 10^6$ UFC de *B. subtilis*, garantindo a esterilidade do produto terminado.

Palavras-chave: gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, efeito da radiação ionizante, esterilidade, esterilização, microrganismos.

STUDY OF THE INFLUENCE OF $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ GENERATOR RADIOACTIVITY ON THE STERILITY OF THE FINISHED PRODUCT

Neuza Taeko Okasaki Fukumori

ABSTRACT

In the manufacturing process of the $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator it is essential not only to prevent the introduction of microbial contaminants, but also evaluate the effect of the radioactivity in microorganisms. The objectives of this work were to study the sterilization processes by gamma rays (^{60}Co) of accessories and alumina column (Al_2O_3) that take part in the generator system and assess the effectiveness of gamma radiation in the death of microorganisms in $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generators of minimum (9.25 GBq) and maximum (74 GBq) radioactivities. Accessories were irradiated with 15, 25 and 50 kGy absorbed doses and alumina columns with 10, 15, 25 and 50 kGy. Alumina from irradiated columns were examined by combined analysis of scanning electron microscopy (SEM) and elemental analysis by energy dispersive spectroscopy (EDS), and X-ray diffraction. Teflon[®] was evaluated by thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Dosimetric calculations were made for the highest dose target on 9.25 GBq and 74 GBq generator columns. Quantified suspensions of *B. subtilis* and *B. pumilus* spores were inoculated into columns irradiated at 25 kGy and it was observed that the alumina column represented a physical barrier to contamination of the eluate, as microbial recovery was reduced. It was found that *B. subtilis* in vegetative form showed lower affinity for alumina when compared to *B. pumilus* spores. Microbial recovery was lower in the generator with radioactivity than with the generator without radioactivity. A biological indicator of *B. pumilus* spores was developed which consisted of an aluminum strip with silica gel placed externally to the column and the microbial recovery in both 9.25 and 74 GBq generators showed reduction in viability. The use of Sep-Pak[®] and 0.22 μm filters in the generator system has shown efficiency in the retention of 4.9×10^6 CFU of *B. subtilis*, ensuring the sterility of the finished product.

Keywords: $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator, ionizing radiation effect, sterility, sterilization, microorganisms.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	22
3. JUSTIFICATIVA	22
4. REVISÃO DA LITERATURA	25
4.1 Radiofármacos	25
4.2 Evolução e desenvolvimento da Radiofarmácia	26
4.3 Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	27
4.4 Esterilidade	31
4.4.1. Microrganismos na fabricação e controle farmacêuticos	33
4.4.2 Cultura de microrganismos – Identificação e quantificação	34
4.4.3 Carga microbiana (Biocarga ou <i>Bioburden</i>)	38
4.4.4 Processos de esterilização	39
4.4.5 Preparação de esporos e indicadores biológicos	46
4.4.6 Métodos de esterilização de radiofármacos	49
4.4.7 Efeitos da contaminação microbiana em geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	50
4.5 Controle biológico de qualidade	53
4.5.1 Teste de esterilidade	54
4.5.2 Apirogenicidade e toxicidade	54
5. MATERIAIS E MÉTODOS	56
5.1 Materiais e equipamentos	56
5.1.1 Materiais	56
5.1.2 Equipamentos	58
5.2 Métodos	59
5.2.1 Determinação da carga microbiana e avaliação dos efeitos das doses de radiação em acessórios de gerador e colunas de alumina	59
5.2.2 Avaliação das colunas de alumina irradiadas	61
5.2.3 Avaliação da eficácia da radiação gama na morte de microrganismos	63
5.2.3.1 Preparação e quantificação de <i>Bacillus subtilis</i> NCTC [®] 10400 e <i>Bacillus pumilus</i> ATCC [®] 14884	64

5.2.3.2 Montagem de coluna com molibdênio “frio” e adição de microrganismos.....	66
5.2.3.3 Montagem de coluna com ⁹⁹ Mo (atividade nominal de 9,25 GBq ou 74 GBq) e adição de microrganismos.....	67
5.2.3.4 Preparação do indicador biológico e quantificação de <i>B. pumilus</i>	68
5.2.3.5 Montagem de gerador de 9,25 GBq e de 74 GBq com indicador de <i>B. pumilus</i>	69
5.2.3.6 Montagem de dois geradores de 9,25 GBq com filtros 0,22 µm e Sep-Pak® e colunas inoculadas com <i>B. subtilis</i>	70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6.1 Determinação de carga microbiana.....	71
6.2 Avaliação dos efeitos das doses de radiação gama e desempenho dos acessórios que compõem o sistema do gerador.....	77
6.3 Avaliação das colunas irradiadas com doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy.....	78
6.3.1 Avaliação visual das colunas de vidro irradiadas.....	80
6.3.2 Análise da alumina por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X.....	81
6.3.3 Análise do Teflon®.....	93
6.3.4 Avaliação dos eluatos de geradores montados com colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy: adição de molibdato não radioativo	96
6.4 Avaliação dos geradores de ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc preparados com colunas submetidas à dose absorvida de 25 kGy.....	99
6.5 Avaliação de desempenho de colunas submetidas à dose absorvida de 25 kGy – estudo de estabilidade.....	103
6.6 Cálculos dosimétricos para condição de maior exposição à radiação e para diferentes posições de um microrganismo.....	106
6.7 Avaliação da eficácia da radiação gama na morte de microrganismos.....	116
6.7.1 Quantificação do <i>B. subtilis</i> – levantamento da curva padrão por espectrofotometria UV-Vis.....	116

6.7.2 Quantificação dos esporos de <i>B. pumilus</i> e curva padrão por espectrofotometria UV-Vis.....	121
6.7.3 Coluna com molibdênio “frio” e <i>B. subtilis</i>	128
6.7.4 Coluna com molibdênio “frio” e esporos de <i>B. pumilus</i>	129
6.7.5 Gerador com atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc e <i>B. subtilis</i>	130
6.7.6 Gerador com atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc e <i>B. pumilus</i>	134
6.7.7 Gerador com atividade nominal de 74 GBq de ^{99m}Tc e <i>B. pumilus</i>	137
6.7.8 Recuperação dos esporos do indicador biológico de <i>B. pumilus</i> ($10^8 - 10^9$ UFC mL $^{-1}$).....	140
6.7.9 Gerador com atividade nominal de 9,25 GBq e indicador biológico de <i>B. pumilus</i>	140
6.7.10 Gerador com atividade nominal de 74 GBq e indicador biológico de <i>B. pumilus</i>	142
6.7.11 Geradores completos com atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc e <i>B. subtilis</i>	145
7. CONCLUSÕES	148
APÊNDICE A - Critérios para avaliação da coluna para gerador.....	150
APÊNDICE B - Formulário para avaliação de estabilidade da coluna de gerador	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Comparação entre métodos de esterilização.....	40
TABELA 2 – Dosímetros de rotina em PMMA utilizados em processos industriais de irradiação.....	44
TABELA 3 – Resultados da carga microbiana dos materiais.....	73
TABELA 4 – Dose de radiação (kGy) necessária para se obter um determinado s para carga microbiana $\geq 1,0$, considerando uma distribuição normal de resistência microbiana.....	75
TABELA 5 – Resultados de carga microbiana (UFC) e as doses de verificação ($s = 10^{-2}$) e de esterilização ($s = 10^{-6}$) correspondentes.....	76
TABELA 6 – Verificação dos efeitos e desempenho dos acessórios para gerador durante o período de seis meses.....	77
TABELA 7 - Resultados de Al, teste de esterilidade e endotoxina bacteriana nos eluatos de geradores montados com colunas irradiadas com 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.....	97
TABELA 8 – Resultados de Al e Mo dos eluatos de geradores montados com colunas irradiadas com 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle, e adicionadas de solução de molibdato de sódio.....	98
TABELA 9 – Especificações para o eluato de pertecnetato de sódio obtido por eluição do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ nas monografias das farmacopeias americana e europeia.....	101
TABELA 10 – Dados obtidos de 10 eluições diárias do gerador de 9,25 GBq....	102
TABELA 11 – Dados obtidos de 10 eluições diárias do gerador de 74 GBq.....	102
TABELA 12 – Identificação das variáveis utilizadas no cálculo dosimétrico e dose total absorvida para gerador de 74 GBq.....	111
TABELA 13 – Identificação das variáveis utilizadas no cálculo dosimétrico e dose total absorvida para gerador de 9,25 GBq.....	112
TABELA 14 – Resultados da dosimetria para microrganismos nas posições lateral da coluna, na base da coluna de alumina e nos filtros Sep-Pak [®] e Millex [®] 0,22 μm em gerador de 9,25 GBq e 74 GBq.....	115
TABELA 15 – Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B.subtilis</i> não diluído.....	117

TABELA 16 – Absorbância em 580 nm de concentrações decrescentes de <i>B. subtilis</i>	118
TABELA 17 – Contagens em UFC das diluições de 10^{-2} a 10^{-6} de <i>B. subtilis</i>	119
TABELA 18 – Parte da Tabela do Número Mais Provável para réplicas de 3 tubos e limites de confiança de 95%.....	120
TABELA 19 – Resultados de contagem microbiana pela técnica do NMP para eluatos obtidos 18 horas e 24 horas após inoculação de <i>B. subtilis</i>	121
TABELA 20 – Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> não diluído.....	123
TABELA 21 – Absorbância em 580 nm de concentrações decrescentes de <i>B. pumilus</i>	124
TABELA 22 – Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> após 3 meses de congelamento – estudo de estabilidade.....	125
TABELA 23 – Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> – repetição.....	126
TABELA 24 – Absorbância em 580 nm de concentrações decrescentes de <i>B. pumilus</i> – repetição.....	126
TABELA 25 – Contagem em UFC das diluições de 10^{-2} a 10^{-5} da mistura dos 10 eluatos.....	129
TABELA 26 – Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> não diluído após eluição exaustiva do gerador.....	130
TABELA 27 – Dados de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq (atividade nominal prevista de 250 mCi) inoculado com <i>B. subtilis</i>	131
TABELA 28 – Teor de alumínio e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador de 9,25 GBq inoculado com <i>B. subtilis</i>	131
TABELA 29 – Contagem em UFC por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. subtilis</i> dos eluatos do gerador controle e de 9,25 GBq.....	132
TABELA 30 – Dados de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq (atividade nominal prevista de 250 mCi) inoculado com esporos de <i>B. pumilus</i>	135
TABELA 31 – Teor de alumínio e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador de 9,25 GBq inoculados com <i>B. pumilus</i>	135

TABELA 32 – Contagem em UFC por placa e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> para os eluatos do gerador controle e de 9,25 GBq.....	136
TABELA 33 – Dados de 5 eluições do gerador de 74 GBq (atividade nominal prevista de 2.000 mCi).....	137
TABELA 34 – Teor de alumínio e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador de 74 GBq inoculados com <i>B. pumilus</i>	138
TABELA 35 – Contagem em UFC do gerador controle e do gerador inoculado com <i>B. pumilus</i> com atividade nominal de 74 GBq de ^{99m} Tc.....	138
TABELA 36 – Contagem microbiana dos segmentos do indicador biológico de <i>B. pumilus</i> . Cada segmento recebeu 10 µL de uma suspensão de esporos de <i>B. pumilus</i> de 1,6 x 10 ⁹ UFC mL ⁻¹	140
TABELA 37 – Contagem microbiana e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> ao longo dos segmentos de um indicador biológico exposto ao gerador de 9,25 GBq.....	141
TABELA 38 – Dados de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq com indicador biológico de <i>B. pumilus</i>	142
TABELA 39 – Contagem microbiana e estimativa da concentração bacteriana de <i>B. pumilus</i> ao longo dos segmentos de um indicador biológico exposto ao gerador de 74 GBq.....	142
TABELA 40 – Dados de 5 eluições do gerador de 74 GBq com indicador biológico de <i>B. pumilus</i>	143
TABELA 41 – Medidas das atividades radioativas das soluções provenientes das lavagens das colunas, teor de alumínio e resultado do teste de esterilidade	145
TABELA 42 – Atividades de ^{99m} Tc, relação ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc, teor de alumínio e resultados do teste de esterilidade provenientes de eluições diárias por cinco dias.....	147

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Esquema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	28
FIGURA 2 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ produzido pelo IPEN-CNEN/SP.....	29
FIGURA 3 – Coluna de alumina do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	29
FIGURA 4 – Etapas do Teste de Gram.....	37
FIGURA 5 – Esquema do decaimento do cobalto-60.....	42
FIGURA 6 – Curva de morte de microrganismo para processo de irradiação..	43
FIGURA 7 – Gráfico da relação entre absorvância e faixa de dose dos três tipos de dosímetros utilizados em processos de irradiação.....	45
FIGURA 8 – Esquema do experimento de Sorensen et al. (1977).....	51
FIGURA 9 – Esquema do experimento de Allwood & McCarthy (1980).....	53
FIGURA 10 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ em corte longitudinal.....	56
FIGURA 11 – Sequência de montagem da coluna do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$..	57
FIGURA 12 – Fluxograma dos ensaios para verificação do efeito da radiação (10, 15, 25 e 50 kGy) em acessórios de gerador e colunas de alumina.....	60
FIGURA 13 - Analisador termogravimétrico TGA-50, marca Shimadzu.....	61
FIGURA 14 - DSC 6000, modelo SDT Q600, marca Perkin Elmer.....	61
FIGURA 15 – Fluxograma dos ensaios para avaliação das colunas de alumina irradiadas com raios gama, após montagem do gerador.....	63
FIGURA 16 – Corte longitudinal da coluna de alumina do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ mostrando a posição de inoculação de microrganismos (a) dentro e (b) fora da coluna.....	64
FIGURA 17 – Diluições seriadas para plaqueamento em profundidade.....	65
FIGURA 18 – Etapas de preparação dos esporos de <i>B. pumilus</i>	66
FIGURA 19 – Esquema e foto do indicador biológico de <i>B. pumilus</i>	68
FIGURA 20 – Preparação e quantificação do indicador biológico de <i>B. pumilus</i>	69
FIGURA 21 – Materiais do sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$: a) conjunto de tampa externa do gerador; b) tampa batoque superior; c) tampa batoque inferior; d) colunas de gerador; e e) sistema de lavagem do gerador.....	72

FIGURA 22 – Posicionamento do dosímetro do tipo <i>Red Perspex Harwell</i> no interior da coluna de vidro, onde A é a parte superior e B a parte inferior do dosímetro.....	79
FIGURA 23 – Curva de calibração para determinação de dose (D) em dosímetros do tipo <i>Red Perspex 4034</i> (lote KZ). As absorbâncias específicas (K) foram medidas em 640 nm.....	80
FIGURA 24 – Colunas de vidro não irradiadas e irradiadas com diferentes doses absorvidas.....	81
FIGURA 25 – Al_2O_3 submetida à dose de 10 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.....	82
FIGURA 26 – Al_2O_3 submetida à dose de 10 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.....	83
FIGURA 27 – Al_2O_3 submetida à dose de 15 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.....	84
FIGURA 28 – Al_2O_3 submetida à dose de 15 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.....	85
FIGURA 29 – Al_2O_3 submetida à dose de 25 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.....	86
FIGURA 30 – Al_2O_3 submetida à dose de 25 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.....	87
FIGURA 31 – Al_2O_3 submetida à dose de 50 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.....	88
FIGURA 32 – Al_2O_3 submetida à dose de 50 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.....	89
FIGURA 33 – Al_2O_3 controle, não submetida à irradiação. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.....	90
FIGURA 34 – Al_2O_3 controle, não submetida à irradiação. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.....	91
FIGURA 35 – Espectros de difração de raios X para as amostras de Al_2O_3 submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.....	92
FIGURA 36 – Espectros de TGA obtidos das amostras de Teflon [®] submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.....	93

FIGURA 37 – Espectros de DSC obtidos das amostras de Teflon® das colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.....	94
FIGURA 38 – Dispositivo montado para a realização das eluições no sistema “frio” (sem atividade radioativa).....	96
FIGURA 39 – Concentração de Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos eluatos de geradores montados com colunas expostas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.....	97
FIGURA 40 – Resultados de Al e Mo nos eluatos provenientes de geradores montados com colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle, e adicionadas de molibdato não radioativo.....	99
FIGURA 41 – Colunas imersas em caldo de TSB dentro de sacos estéreis descartáveis para o teste de esterilidade.....	100
FIGURA 42 – Colunas dos geradores desmontados de 9,25 GBq à esquerda, e de 74 GBq à direita, após cerca de 10 semanas de carregamento de ^{99}Mo	103
FIGURA 43 – Sistema para avaliação das colunas irradiadas a 25 kGy.....	104
FIGURA 44 – Colunas controle para comparação visual de cor.....	104
FIGURA 45 – Variação dos tempos médios (a) e volumes médios (b) de eluição, em colunas esterilizadas a 25 kGy, durante seis meses.....	105
FIGURA 46 – Esquema da coluna do gerador. a) sem ^{99}Mo , b) alumina com região de concentração de ^{99}Mo destacada em vermelho.....	107
FIGURA 47 – Coluna de vidro que foi exposta à radiação do ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ à esquerda, e coluna não exposta, à direita.....	107
FIGURA 48 – Construção de um cilindro utilizando coordenadas cartesianas.	108
FIGURA 49 – Reconstrução do cilindro de alumina identificando o ponto alvo para cálculo dosimétrico ($r = 7,0 \text{ mm}$ e $h = 10 \text{ mm}$).....	109
FIGURA 50 – Curva de eluição do gerador de 74 GBq a cada 4 horas.....	113
FIGURA 51 – Dosimetria gama em um microrganismo na lateral da coluna de vidro de um gerador de 74 GBq.....	113
FIGURA 52 – Dosimetria gama em um microrganismo na parte inferior da coluna de alumina de um gerador de 74 GBq.....	114
FIGURA 53 – Ilustração da posição de um microrganismo na lateral (a) e parte inferior (b) da coluna de vidro para o cálculo dosimétrico.....	114

FIGURA 54 – Ilustração da posição de um microrganismo no filtro Sep-Pak® e no filtro Millex® 0,22 µm para o cálculo dosimétrico.....	115
FIGURA 55 – <i>B. subtilis</i> . (a) Cultura mãe em ágar inclinado; (b) Cultura de 24 horas.....	116
FIGURA 56 – <i>Pour-plate</i> da série de diluições de <i>B. subtilis</i>	117
FIGURA 57 – Curva padrão de <i>B. subtilis</i>	118
FIGURA 58 – <i>B. pumilus</i> : (a) Cultura mãe; (b) Cultura de 24 horas.....	121
FIGURA 59 – (a) Coloração de Gram e (b) Coloração de Wirtz-Conklin dos esporos de <i>B. pumilus</i> (aumento de 1.000x).....	122
FIGURA 60 – <i>Pour-plate</i> da série de diluições de <i>B. pumilus</i>	122
FIGURA 61 – Curva padrão de <i>B. pumilus</i>	124
FIGURA 62 – Curva padrão de <i>B. pumilus</i> – repetição.....	127
FIGURA 63 – Curvas padrão para determinação da concentração de <i>B. subtilis</i> e <i>B. pumilus</i>	128
FIGURA 64 – Gráfico comparativo da recuperação (UFC) de <i>B. subtilis</i> no gerador controle e no gerador de 9,25 GBq.....	134
FIGURA 65 – Gráfico comparativo da recuperação (UFC) de <i>B. pumilus</i> no gerador controle e no gerador de 9,25 GBq.....	137
FIGURA 66 – Gráfico comparativo da recuperação (UFC) de <i>B. pumilus</i> no gerador controle e no gerador de 74 GBq.....	139
FIGURA 67 – Gráfico comparativo das contagens do indicador biológico de <i>B. pumilus</i> nos geradores controle e nos geradores de 9,25 e 74 GBq em relação ao indicador biológico inicial.....	144
FIGURA 68 – Colônias características de <i>B. subtilis</i> em placa de TSA.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCTM	Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais
CNEA	Comisión Nacional de Energía Atómica
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CQA	Centro de Qualidade Analítica
CR	Centro de Radiofarmácia
CTR	Centro de Tecnologia das Radiações
dps	Desintegração por segundo
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EDS	<i>Energy-dispersive Spectroscopy</i>
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>
FB	Farmacopeia Brasileira
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry</i>
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ISO	<i>International Standards Organization</i>
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
MBq	Megabequerel
mCi	Millicurie
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NTP	<i>Nuclear Technology Products</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i> (Politetrafluoretileno)
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i> (Cloro de polivinila)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>

SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TLC-SG	<i>Thin Layer Chromatography – Silica Gel</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
VDmax	<i>Verification Dose Maximum</i>

1. INTRODUÇÃO

Os produtos submetidos à vigilância sanitária, respeitando as suas particularidades, devem ser produzidos, dispensados, armazenados e transportados de forma a apresentarem a segurança necessária para o seu uso e consumo (Pinto et al., 2010).

O processo de fabricação exerce grande influência sobre os níveis de contaminação microbiana no produto, por isso é fundamental que se conheçam as fontes e os mecanismos responsáveis pela introdução de contaminantes microbianos, que podem estar presentes nas matérias-primas sendo invariavelmente transferidos ao produto, acrescidos dos oriundos de equipamentos e ambientes produtivos, dos operadores envolvidos e dos materiais de embalagem quando não existem condições adequadamente controladas (Pinto et al., 2010).

Para os radiofármacos injetáveis, mais especificamente o eluato de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtido no sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, é parte integrante das Boas Práticas de Fabricação (BPF) que, para serem estéreis, sejam preparados sob condições que excluam a contaminação microbiana no produto (EudraLex, 2008; BRASIL RDC nº 63, 2009). Assim, o processo de esterilização das partes que compõem o gerador e o ^{99}Mo exercem um papel importante na garantia da esterilidade, para promover a completa eliminação ou destruição de diferentes microrganismos, compatibilizando com nível de segurança desejável, tanto para o paciente, quanto para o usuário ou operador (Zolle, 2007; Hammad, 2008).

Os microrganismos podem se portar como agentes infectantes oportunistas ocasionando risco à segurança do consumidor. A presença de cepas reconhecidamente patogênicas representa um potencial para aquisição de um quadro clínico infeccioso, ou de transferência de toxinas igualmente indesejáveis. A garantia da esterilidade do radiofármaco injetável é de elevada importância, levando-se em consideração o fato de que os pacientes podem ser pessoas debilitadas, por vezes inclusive imunodeprimidas (Pinto et al., 2010).

Um cuidadoso e amplo estudo do processo do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ sob condições padronizadas poderá viabilizar a esterilização da coluna de alumina por radiação gama e a avaliação da ação da atividade radioativa sobre microrganismos presentes no sistema.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: 1) Estudar os processos de esterilização por irradiação com raios gama (^{60}Co) dos acessórios e da coluna de alumina (Al_2O_3) que compõem o sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$; e 2) Avaliar a eficácia da radiação gama (^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$) na morte de microrganismos em geradores $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ de diferentes atividades radioativas produzidos no Centro de Radiofarmácia (CR), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), compreendendo geradores de 9,25 GBq (250 mCi) e 74 GBq (2000 mCi).

3. JUSTIFICATIVA

Durante muitos anos o governo federal deteve o monopólio da produção, importação e distribuição de radionuclídeos e radiofármacos no país. Após a quebra do monopólio para produção e comercialização de radiofármacos de meia vida física igual ou menor do que duas horas em 2006, foram publicadas em dezembro de 2009, as RDC nº 63 e RDC nº 64, que regulamentaram as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Radiofármacos e o Registro de Radiofármacos, respectivamente (BRASIL RDC nº 63, 2009; BRASIL RDC nº 64, 2009).

Atualmente, a esterilização da coluna de alumina onde é depositada a matéria prima do gerador que é o radionuclídeo ^{99}Mo na forma química de $^{99}\text{MoO}_4^-$ é realizada por autoclavação. Porém, pretende-se estudar a viabilidade da esterilização por radiação gama, o que implicaria em uma nova alternativa que pode ser economicamente interessante pela existência de um irradiador industrial de ^{60}Co dentro da área do IPEN, e asseguraria um processo seguro e eficaz. A avaliação de diferentes variáveis na esterilização por radiação gama dos diversos materiais utilizados na montagem do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ não foi encontrada na literatura, nem estudos de outros parâmetros, a saber, eficácia da esterilização de colunas das alumina por radiação gama, alterações físicas e desempenho de eluição, assim como esterilidade e endotoxina bacteriana, pureza radionuclídica, pureza radioquímica e pureza química dos eluatos de geradores produzidos com essas colunas.

No processo de produção dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ em que não há áreas com classificação de ar, decorrente de uma infraestrutura antiga, é importante avaliar quantitativamente se a atividade radioativa devido ao $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ presente na co-

luna de alumina é capaz de inativar microrganismos, e contribuir para a esterilização do sistema e para o uso seguro do produto.

O estudo da eficácia esterilizante da atividade radioativa dos radiofármacos foi descrita em poucos trabalhos (Sorensen et al., 1977; Allwood & McCarthy, 1980). Não foram encontradas publicações recentes a respeito desse assunto, provavelmente porque a imensa maioria dos fabricantes de geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ no mundo pertence à iniciativa privada, tornando inviável, financeiramente, a disponibilidade tanto da matéria prima como do próprio sistema do gerador para esse tipo de investigação, além do risco da dose de radiação envolvida na manipulação do material radioativo.

A ausência de contaminação microbiana em produto radioativo parece ser óbvia, porém poucos relatos na literatura comprovam esta afirmação. Estudos realizados no passado para investigar a influência da radiação nos microrganismos presentes nos produtos, certamente não seguiram os padrões de qualidade exigidos atualmente.

Na literatura, as atividades radioativas dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ estudados foram baixas (3,7 GBq ou até geradores praticamente exauridos, ou seja, sem atividade radioativa). Sorensen et al. desmontaram geradores utilizados na rotina, após decaimento da atividade radioativa e as colunas de alumina foram autoclavadas, em seguida contaminadas com diferentes cepas de microrganismos, avaliando-se a recuperação desses microrganismos (Sorensen et al., 1977). Allwood e McCarthy (1980) utilizaram diferentes geradores com colunas carregadas e não carregadas com molibdato de amônio e colunas radioativas com pelo menos 3,7 GBq (100 mCi) de atividade residual de ^{99}Mo e verificou-se a recuperação de *Escherichia coli* e a presença de pirogênio nos eluatos.

A proposta deste trabalho é utilizar geradores com atividades radioativas mais altas, até 74 GBq (2.000 mCi), pois nenhuma publicação tratou da ampla faixa de atividade radioativa, nem da abrangência da investigação proposta, além do uso de microrganismos comprovadamente resistentes à radiação, como por exemplo, esporos de *B. pumilus* (Singh et al., 2006; Pinto et al., 2010). Este trabalho tem fundamental importância para a área da saúde, especialmente para a medicina preventiva e diagnóstica, cujos milhares de procedimentos realizados em medicina nuclear, principalmente nas áreas de oncologia, cardiologia e neurologia, beneficiam a popu-

lação brasileira. Dessa maneira contribuirá para o uso seguro dos radiofármacos produzidos dentro dos padrões de qualidade requeridos e isentos de contaminação microbiana, pois quando se trata de paciente com sistema imunológico fragilizado ou mesmo criança, um produto contaminado apresenta risco potencial considerável, podendo levar à morte.

Pretende-se ainda desenvolver métodos para estudos de recuperação, quantificação e identificação de microrganismos, auxiliando na interpretação de resultados de possíveis contaminações microbianas nos ensaios de esterilidade e de monitoramento microbiológico ambiental.

Originalidade do trabalho

- O estudo da eficácia esterilizante da atividade radioativa dos radiofármacos foi descrita em poucos trabalhos;
- Não foram encontradas publicações recentes a respeito desse assunto - a imensa maioria dos fabricantes de geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ no mundo pertence à iniciativa privada, tornando inviável financeiramente, a disponibilidade tanto da matéria-prima ^{99}Mo , como do próprio gerador para esse tipo de investigação;
- A ausência de contaminação microbiana em produto radioativo parece ser óbvia, porém poucos relatos na literatura comprovam esta afirmação;
- Estudos realizados no passado para investigar a influência da radiação nos microrganismos presentes nos produtos, certamente não seguiram os padrões de qualidade exigidos atualmente;
- Nenhum trabalho tratou de ampla faixa de atividade radioativa (até 74 GBq) para o gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, nem da abrangência da investigação proposta com o uso de esporos de *B. pumilus*, resistentes à radiação; e
- Estudos de Sorensen e col. (1977) e de Allwood e McCarthy (1980) envolveram geradores de atividades baixas (3,7 GBq) ou praticamente exauridos.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Radiofármacos

Radiofármacos são compostos, sem ação farmacológica, que possuem radionuclídeos na sua composição e são utilizados em Medicina Nuclear para diagnóstico e terapia de várias doenças (Saha, 2003; Oliveira et al., 2006; EP 7, 2010).

Segundo a RDC nº 64, os radiofármacos são classificados em: I – radiofármacos prontos para o uso; II – componentes não-radioativos para marcação com um componente radioativo; e III – radionuclídeos, incluindo eluatos de geradores de radionuclídeos (BRASIL RDC nº 64, 2009).

Os radiofármacos que se destinam ao diagnóstico clínico possuem um radionuclídeo emissor gama (γ) e/ou de pósitron (β^+). Nesta situação, é desejável que o radionuclídeo incorporado ao radiofármaco não emita partículas alfa (α) ou beta (β), uma vez que estas apenas aumentam a dose de radiação absorvida pelo paciente (Saha, 2003; Oliveira et al., 2006).

Os radiofármacos para terapia devem incluir na sua composição, um radionuclídeo emissor de partículas ionizantes (α , β^- ou elétrons Auger), pois sua ação se baseia na destruição seletiva de tecidos patológicos (Oliveira et al., 2006).

Em Medicina Nuclear, dois métodos tomográficos são utilizados para aquisição de imagens, a saber, o SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) que utiliza radionuclídeos emissores γ (^{99m}Tc , ^{123}I , ^{131}I , ^{67}Ga , ^{201}Tl , entre outros) e o PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons), para radionuclídeos emissores de pósitrons (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{124}I , ^{68}Ga , etc) (Oliveira et al., 2006).

A maioria dos radiofármacos é administrada por via parenteral, geralmente intravenosa, e, portanto, são imprescindíveis as condições de esterilidade e apirogenicidade. É necessário então seguir protocolos e adotar técnicas de dispensação adequadas para que o radiofármaco preparado seja seguro para administração ao paciente (Sampson, 1990).

Para a fabricação de radiofármacos, devem ser aplicadas as Boas Práticas Radiofarmacêuticas, que incluem, não só a utilização de técnicas assépticas para a produção, controle de qualidade e fracionamento de doses, os cuidados necessários para o atendimento às normas de proteção radiológica, bem como as recomendações para trabalho em cabines de fluxo laminar, limpeza e assepsia das áreas, es-

pecialmente quando se tratar de marcação de células autólogas (Castiglia et al., 1999).

A validação de cada etapa dos processos que envolvem a produção de radiofármacos é necessária, para que a sua qualidade seja assegurada. Deve haver evidência documentada que ateste com alto grau de segurança que um processo específico produzirá um produto de forma consistente, que cumpra com as especificações pré-definidas e com características de qualidade (BRASIL RDC nº 63, 2009; BRASIL RDC nº 17, 2010).

4.2 Evolução e desenvolvimento da Radiofarmácia

O IPEN, por meio do seu antigo Departamento de Processamento de Material Radioativo (TP) atual Centro de Radiofarmácia (CR), foi a instituição pioneira na produção de radionuclídeos e radiofármacos no Brasil.

A produção experimental iniciada em 1959 com o radiofármaco Iodo-131 que é utilizado para diagnóstico e terapia de doenças da tireóide foi fundamental para a viabilização e consolidação da medicina nuclear no país. Subsequentemente, ao longo dos anos, substâncias marcadas com ^{51}Cr e ^{131}I foram desenvolvidas para estudo e diagnóstico de diversas funções do organismo humano (IPEN-CR, 2015).

No final de 1980, médicos nucleares consultaram o IPEN sobre a possibilidade de produção no país dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, até então importados em virtude do seu crescente uso. Foi estabelecido um programa de desenvolvimento e os trabalhos experimentais com ^{99}Mo importado do Canadá foram implementados. Em 1981, iniciou-se o atendimento a hospitais e clínicas do país com geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ preparados com tecnologia nacional, atendendo uma demanda inicial de 10 geradores por semana (IPEN-CR, 2015).

Atualmente são produzidas mais de trezentas unidades de geradores por semana, tendo três fornecedores distintos de ^{99}Mo : Canadá, África do Sul e Argentina. A crise no fornecimento de ^{99}Mo , devido à parada do reator nuclear do Canadá em 2009, levou o país a buscar novos parceiros para o comércio.

Mais de 30 produtos, entre radiofármacos prontos para o uso (radionuclídeos primários e moléculas marcadas), componentes não-radioativos para marcação com um componente radioativo (reagentes liofilizados para marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$) e

geradores de radionuclídeos (gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) estão disponíveis para a classe médica para diagnóstico e/ou terapia de diversas enfermidades, especialmente em cardiologia, oncologia e neurologia.

4.3 Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

O crescimento e a extensa aplicação da medicina nuclear diagnóstica tem sido norteada principalmente pela fácil disponibilidade através do sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Sampson, 1990; Mahmood & Jones, 2005; Weatherman, 2010). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ decai por transição isomérica para ^{99}Tc emitindo fótons de energia de 140 keV (87,9%) os quais são adequados para a aquisição de imagens. Sua meia-vida física de 6 h é longa o suficiente para obter a informação diagnóstica desejada em muitos estudos e curta o suficiente para causar mínima exposição de radiação do paciente e do operador (Owunwane et al., 1995; Thrall & Ziessman, 2003; Oliveira et al., 2006).

Mesmo atualmente, mais do que 80% das investigações diagnósticas são realizadas com este radionuclídeo. A química versátil do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ devido aos seus múltiplos estados de oxidação e, conseqüentemente, à habilidade para produzir uma variedade de complexos com características desejáveis peculiares são as principais vantagens do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como um radionuclídeo para o desenvolvimento de novos radiofármacos. Métodos de marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ alcançaram um alto grau de eficiência pela possibilidade de obtenção de altas atividades específicas necessárias para alcançar alvos de baixa concentração (Thrall & Ziessman, 2003).

Os geradores de radionuclídeos foram desenvolvidos para aplicações médicas pela conveniência na obtenção desses radionuclídeos nas clínicas e hospitais. Em princípio, o radionuclídeo pai de vida mais longa gera um radionuclídeo filho de vida mais curta por decaimento radioativo. O crescimento do radionuclídeo filho continua até que um máximo é alcançado, constituindo um estado de equilíbrio com o radionuclídeo pai. Desde que sejam elementos diferentes, o radionuclídeo filho pode ser separado por um processo químico simples, geralmente por eluição líquida (Thrall & Ziessman, 2003; Zolle, 2007; Weatherman, 2010).

O gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ consiste em uma coluna de vidro, contendo alumina (Al_2O_3) na qual o ^{99}Mo produzido pela fissão do ^{235}U é adsorvido. O nuclídeo pai de meia-vida física de 66 h decai para o filho $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de meia-vida física de 6 h. Como a

afinidade do radionuclídeo filho pela alumina é pequena, este pode ser eluído facilmente utilizando-se solução fisiológica e frasco em vácuo estéril. A coluna é fechada em ambas as extremidades e em uma das extremidades há um filtro de 0,22 μm . O gerador é blindado com chumbo e o sistema todo é adequadamente protegido para reduzir a exposição do operador à radiação (Owunwane et al., 1995; Marques et al., 2001; Mausner & Mirzadeh, 2005; Oliveira et al., 2006; Zolle, 2007). Na FIG. 1 apresenta-se o esquema de um gerador e na FIG. 2 é mostrada a foto de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ fabricado no IPEN-CNEN/SP.

FIGURA 1 – Esquema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Oliveira et al., 2006).

FIGURA 2 - Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ produzido pelo IPEN-CNEN/SP.

O eluato assim obtido é uma solução injetável límpida, incolor, estéril e isotônica que pode ser utilizada diretamente nos pacientes ou após a preparação de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com diferentes *kits* (reagentes liofilizados para marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$) (Mahmood & Jones, 2005; Zolle, 2007; Galbraith, 2010).

Uma coluna de vidro com alumina e tiras de Teflon[®] do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é apresentada na FIG. 3.

FIGURA 3 – Coluna de alumina do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

A alumina pode se apresentar em diversas formas de transição diferenciadas por letras gregas, sendo que a mais estável é a forma alfa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). Segundo Brockmann e Schodder (1941), a alumina é classificada em cinco tipos (I a V) e a sua atividade está relacionada com a quantidade de água adsorvida e é determinada em função de sua capacidade de adsorver uma série de corantes: azobenzeno, p-metoxiazobenzeno, amarelo Sudan, vermelho Sudan, p-aminoazobenzeno e p-hidroxiazobenzeno. A alumina com atividade grau I é a mais ativa porque tem maior poder de adsorção desses corantes e é a mais usada em cromatografia em coluna, e a de grau V é a menos ativa e contém maior quantidade de água (15%) (Brockmann & Schodder, 1941; Vichenewski, 2007; Fukumori, 2012). A alumina é uma substância cristalina porque possui uma estrutura geométrica definida. Cada material cristalino difrata os raios X em diferentes direções e intensidade, o que torna possível a identificação de sua estrutura cristalina (Cienfuegos & Vaitsman, 2000). A difração de raios X é uma técnica usada para determinar a estrutura interna de uma amostra cristalina. Na difração de raios X, o padrão de difração apresenta uma série de reflexões as quais são identificadas no difratograma pelo ângulo (2θ) ou pela distância interplanar (d) contra a sua intensidade. Este padrão está relacionado à composição química e ao ordenamento cristalino das moléculas no cristal (Storpiritis, 2009).

A alumina pode ser visualizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que é uma técnica útil para a caracterização de diferentes materiais que se baseia na irradiação de um feixe fino de elétrons sobre uma amostra. A interação entre o feixe e a superfície da amostra resulta na emissão de uma série de radiações que podem ser elétrons secundários, elétrons Auger, fótons, raios X característicos, etc. A detecção dos elétrons secundários é a responsável pela imagem de alta resolução da topografia da superfície da amostra analisada. O aumento da imagem pode chegar a 300.000 vezes e são utilizadas escalas entre nanômetros e centenas de micrômetros (Storpiritis, 2009).

Na parte superior da coluna do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ são colocadas tiras de Teflon[®] para promover a distribuição homogênea da solução de $^{99}\text{MoO}_4^{-2}$ na alumina.

Teflon[®] é o termo comercialmente utilizado para o politetrafluoroetileno, em inglês *polytetrafluoroethylene* (PTFE), um polímero com aplicações em muitas áreas,

pelo fato de ser quimicamente inerte e apresentar baixo coeficiente de atrito (Callister Jr, 2002).

Entre as técnicas de análise térmica que podem ser usadas para avaliação do Teflon[®] estão a termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC). Na termogravimetria, a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura. A TG permite avaliar fenômenos químicos (quimiossorção, dessolvatação, decomposição, degradação oxidativa, degradação redutiva e reações de estado sólido) e físico-químicos (desidratação, vaporização, sublimação, adsorção, dessorção e absorção). A calorimetria exploratória diferencial mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a um programa controlado de temperatura. A DSC permite acompanhar e obter dados quantitativos quanto às alterações físicas ou químicas da amostra, por exemplo, mudança de estado físico, transições de fase ou reações de desidratação, de decomposição, etc (Gil, 2007; Holler et al., 2009; Storpirtis, 2009).

4.4 Esterilidade

A esterilidade indica a ausência de qualquer bactéria ou microrganismo viável em uma preparação farmacêutica ou radiofarmacêutica com aplicação de métodos apropriados de esterilização, que dependem da característica do produto, do solvente e dos excipientes, para garantir a qualidade do produto (Castiglia et al., 1999; Saha, 2003; Oliveira et al., 2006). O conceito de esterilidade refere-se à total ausência de formas viáveis capazes de reprodução. A afirmação absoluta da esterilidade dos produtos proporcionada por um processo esterilizante é questionada atualmente com o conhecimento estatístico referente à morte microbiana (ISO 11137-1, 2006; Pinto et al., 2010).

A destruição de microrganismos por agentes físicos ou químicos segue uma lei exponencial. Pode-se calcular a probabilidade finita de um organismo sobrevivente sem levar em conta a magnitude do tratamento ou dose absorvida durante a esterilização. A probabilidade de sobrevivência é uma função do número e espécies de microrganismos presentes no produto, da letalidade no processo de esterilização e,

em algumas circunstâncias, do ambiente em que vivem os microrganismos durante o tratamento. Assim, a esterilidade de um item particular numa população de produtos que sofreram esterilização não pode ser assegurada de maneira absoluta (Thrall, 2003; ISO 11137-1, 2006; Hammad, 2008; Trabulsi & Alterthum, 2008).

Para que o processo esterilizante de inativação microbiana seja eficaz seguindo o critério de redução logarítmica, é necessário garantir uma carga inicial extremamente baixa, de forma que níveis de potenciais negativos elevados correspondam à mínima presença microbiana (ISO 11137-1, 2006; Pinto et al., 2010).

Um microrganismo é definido como morto quando não mais prolifera em meios de cultura onde este fato usualmente ocorreria; considera-se como forma de constatação de crescimento microbiano a turbidez de meios líquidos ou o surgimento de colônias em meios sólidos. Um organismo único deve ser capaz de proliferar através de muitas gerações para ser detectado, portanto um microrganismo que não possa se reproduzir, ou possa fazê-lo apenas durante poucas gerações, pode por esse critério ser considerado morto (Pelczar et al., 1996; Pinto et al., 2010).

A exposição a um processo de esterilização adequadamente validado e controlado não é o único fator associado à garantia de que o produto seja estéril. Outros fatores são fundamentais, entre eles: a) a condição microbiológica de matérias primas e componentes num processo de fabricação; b) a validação e controle de rotina do ambiente de manipulação; b₁) o procedimento de limpeza e desinfecção; b₂) o controle microbiológico onde o lote do produto deverá ser processado e lacrado; b₃) o controle do pessoal e a sua higienização (uso de vestimenta especial devidamente esterilizada); c) a maneira como o produto será processado e embalado e d) as condições sob as quais o produto deverá ser estocado (ISO 11137-1, 2006; Pinto et al., 2010; EP 7, 2010).

Para produtos farmacêuticos e correlatos, a denominação estéril é geralmente atribuída aos produtos nos quais, após finalização do processo esterilizante, itens individuais apresentem a probabilidade de serem estéreis, ou um nível de garantia de esterilidade, ou *Sterility Assurance Level* (SAL). O SAL é uma estimativa da efetividade de um processo esterilizante e é expresso como uma probabilidade na forma de 1×10^{-n} (Soliman et al., 2013). Como o SAL é considerado um conceito difícil de interpretar, muitos preferem a expressão “Probabilidade de uma Unidade Não Estéril” que é definida como o número que expressa a probabilidade de encontrar uma

unidade não estéril em um número conhecido de unidades esterilizadas, ou a probabilidade de que uma única unidade tenha um microrganismo sobrevivente (ISO 11137-1, 2006; Pinto et al., 2010).

4.4.1 Microrganismos na fabricação e controle farmacêuticos

Os microrganismos relevantes para a fabricação e controle farmacêuticos são classificados em três grupos principais: bactérias, fungos e vírus. Bactérias (procariotos) e fungos (eucariotos) podem existir como células únicas, ou aglomerados de células com pouca ou nenhuma diferenciação na morfologia, função, ou ambos. Enquanto que as bactérias e fungos possuem estrutura celular para se replicar, os vírus são menores e mais simples e dependem de sistemas celulares procariotos ou eucariotos para a replicação (Clontz, 2009; Pinto et al., 2010; Saghee et al., 2011).

Algumas espécies de bactérias produzem formas latentes resistentes chamadas esporos e cistos que podem sobreviver em condições desfavoráveis, tais como dessecação e calor. Essas formas de repouso são metabolicamente inativas, o que significa que elas não estão crescendo. Entretanto, podem germinar sob condições ambientais apropriadas e tornar-se células vegetativas metabolicamente ativas que crescem e se multiplicam. Os esporos que se formam dentro da célula bacteriana são chamados endósporos e possuem parede celular espessa, variando em forma e localização dentro da célula. Enquanto as células vegetativas são mortas em temperaturas acima de 70 °C, a maioria dos endósporos pode resistir a 80 °C por até 10 minutos. Aparentemente ocorre um processo de desidratação durante a esporulação que elimina grande parte da água do esporo, contribuindo para a resistência ao calor (Pelczar et al., 1996; Trabulsi & Alterthum, 2008).

Uma população microbiana, sob condições naturais, pode conter muitas espécies diferentes, sendo relevante identificar quantos e quais tipos de microrganismos estão presentes em um ambiente particular. Pode haver microrganismos que causam doenças (patogênicos), outros que fazem parte da população microbiana normal que habita o intestino (*Escherichia coli*), além de microrganismos saprófitas que vivem no corpo humano (Pelczar et al., 1996).

A multiplicação de contaminantes, particularmente bactérias Gram (-) ocorre rapidamente nos espaços mortos, onde água e resíduos do produto se acumulam, ocasionando contaminação persistente e de difícil eliminação, constituindo biofilmes,

constituindo grande risco potencial (Clontz, 2009; Pinto et al., 2010).

Existem evidências de que a contaminação ambiental, às vezes considerada menos importante quando não entra em contato direto com o produto, transfere contaminação quando não há condições adequadamente controladas. Contaminantes ambientais de paredes secas compreendem principalmente bacilos Gram (+), cocos e fungos. Em áreas úmidas, como pias e drenos, ocorre acúmulo de *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, que não apenas sobrevivem, mas proliferam. A contaminação aérea é principalmente associada à poeira e às escamas da pele, que por sua vez são veículos de esporos bacterianos e cocos (Clontz, 2009; Pinto et al., 2010).

A contaminação advinda dos operadores é normalmente significativa, pois durante as atividades normais, a perda de escamas da pele é da ordem de 10^4 por minuto. Os contaminantes transportados por essas escamas são micrococos não patogênicos, difteróides e estafilococos, mas também podem ser *Staphylococcus aureus* que fazem parte da flora normal. Outros, como *Salmonella* e *Escherichia coli*, embora não constituam a flora residente, podem estar presentes, dependendo dos hábitos de higiene dos operadores (Pinto et al., 2010).

No caso de radiofármacos, a avaliação do risco de contaminação microbiológica durante a fabricação tem grande relevância, mas também é possível a sua ocorrência durante o uso clínico, na preparação de radiofármacos de ^{99m}Tc e na retirada e aplicação das doses nos hospitais e clínicas de medicina nuclear (Saha, 2003). Em se tratando de paciente com sistema imunológico fragilizado ou mesmo criança, um produto contaminado apresenta risco potencial considerável, podendo levar à morte (Pinto et al., 2010).

4.4.2 Cultura de microrganismos – Identificação e quantificação

De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Alguns microrganismos podem crescer com algumas poucas substâncias inorgânicas, enquanto outros se assemelham aos organismos superiores na sua necessidade de compostos orgânicos complexos, mas todos compartilham algumas necessidades nutricionais em comum, tais como carbono, nitrogênio e água (Pelczar et al., 1996).

O cultivo de microrganismos em laboratório requer meios de cultura apropriados. Os meios são preparações de nutrientes com composição química definida uti-

lizados para o crescimento dos microrganismos. Existem diferentes tipos de meios destinados a fornecer informações específicas sobre os microrganismos (Pelczar et al., 1996). Nos laboratórios de microbiologia farmacêutica, utilizam-se métodos clássicos comprovados, confiáveis e aceitos pelas autoridades regulatórias que se baseiam em métodos de cultivo. Esses métodos não são dispendiosos, caracterizam-se por execução simples e por dispensarem equipamentos especializados. Novas tecnologias têm sido introduzidas recentemente, as quais geram resultados mais rápidos, e apresentam potencial para oferecer maior sensibilidade e exatidão quando comparadas aos métodos existentes, porém ainda não são amplamente utilizadas para liberação de produtos na indústria farmacêutica (Pinto et al., 2010).

Os métodos de testes microbiológicos podem ser divididos em três amplas categorias gerais, considerando sua finalidade (Pinto et al., 2010):

- Detecção de presença ou ausência de microrganismos em uma amostra-teste;
- Enumeração de microrganismos presentes na amostra-teste; e
- Caracterização e identificação de microrganismos recuperados de produto isolado ou ambiental.

Como exemplo dos testes de presença ou ausência são os testes de esterilidade, em que um número definido de unidades do produto é testado quanto à presença ou ausência de microrganismos em dois meios de cultura, caseína soja e tio-glicolato, em diferentes condições de incubação, a $22,5 \pm 2,5$ °C e $32,5 \pm 2,5$ °C, respectivamente (Pinto et al., 2010).

A enumeração microbiana baseia-se no crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas ou membranas filtrantes. O número de colônias, derivado da enumeração de uma alíquota de uma diluição específica, fornece a contagem de microrganismos por unidade de amostra (Pinto et al., 2010).

O crescimento individual de uma bactéria requer observações cuidadosas porque esse processo pode ser relativamente rápido e as condições necessárias para a medida do crescimento devem ser adequadas. O desenvolvimento de uma cultura pode ser medido tanto pelo aumento de protoplasma (massa) como pelo número de organismos (Trabulsi & Alterthum, 2008).

O número de microrganismos em uma dada amostra pode ser estimado por métodos diretos ou indiretos. Entre os métodos diretos, estão os contadores de partículas que são equipamentos baseados em desvios ópticos e eletrônicos, as câmaras de contagem (ex. Câmara de Neubauer) e os esfregaços corados visualizados em microscópio. Os métodos indiretos de contagem de partículas estão baseados na capacidade de multiplicação dos microrganismos quando transferidos para um meio de cultura novo, por exemplo, a diluição seriada ou do número mais provável (NMP), e o plaqueamento em meio sólido (Trabulsi & Alterthum, 2008; USP 37, 2014).

Na diluição seriada ou do número mais provável, a cultura é diluída até um ponto em que amostras da diluição, quando semeadas em meio apropriado, não apresentam crescimento microbiano. O plaqueamento em meio sólido pode ser feito por semeadura em profundidade (*pour-plate*) ou em superfície (Trabulsi & Alterthum, 2008).

Para se definir um volume que contenha a densidade recomendada de células, são necessárias diluições em série a partir de uma suspensão estoque. Pela contagem em placas, determina-se a densidade microbiana para cada diluição. Com procedimento bem padronizado, podem-se reproduzir os resultados com a mesma cepa microbiana. É recomendável a utilização de subculturas de microrganismos em até, no máximo, cinco transferências a partir da cultura original (FB 5, 2010).

A aplicação do método espectrofotométrico a amostras biológicas requer a construção prévia de curva-padrão ajustada à espécie de microrganismo quantificada e à matriz (no caso, o diluente da suspensão bacteriana) (Norrell & Messley, 1997; Pinto et al., 2010). A partir dos valores de log (concentração bacteriana) *versus* absorbância a 580 nm é construída a curva-padrão para quantificação com a reta aproximada pelo método dos mínimos quadrados (FB 5, 2010).

A identificação de microrganismos é tradicionalmente baseada na morfologia de sua colônia, morfologia celular, coloração diferencial, requisitos para crescimento e perfil de utilização de carbono (Trabulsi & Alterthum, 2008; Pinto et al., 2010).

Uma das mais importantes técnicas para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é o teste de coloração de Gram. O mecanismo da coloração de Gram se refere à composição da parede celular, sendo que as Gram-positivas pos-

suem uma espessa camada de peptídeoglicano e ácido teicóico, e as Gram-negativas, uma fina camada de peptídeoglicano, sobre a qual se encontra uma camada composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos. Nesse processo, o esfregaço bacteriano é tratado com os seguintes reagentes: corante púrpura cristal violeta, solução de lugol (iodo), álcool etílico (ou álcool-acetona), corante vermelho fucsina ou safranina (Pelczar et al., 1996; Ribeiro & Soares, 2000). O tratamento com álcool (ou álcool-acetona) extrai os lipídeos, assim o complexo cristal violeta-lugol é retirado e descora a bactéria Gram-negativa, que se cora de vermelho com a fucsina (ou safranina), enquanto que a bactéria Gram-positiva permanece violeta (Pelczar et al., 1996; Ribeiro & Soares, 2000; Saghee et al., 2011). Na FIG. 4 estão representadas as etapas do teste da coloração de Gram.

FIGURA 4 - Etapas do Teste de Gram, adaptado de Pelczar et al. (1996).

Para visualização da forma vegetativa e dos esporos bacterianos, uma das técnicas mais utilizadas é o Método de Wirtz-Conklin que consiste no uso de uma solução aquosa de verde malaquita a 5% como corante principal e posteriormente, a safranina, como corante de contraste. Desta forma, o esporo se cora de verde, porém o restante da célula ou a célula que não possui esporo se tingem de vermelho ou rosa (Ribeiro & Soares, 2000).

4.4.3 Carga microbiana (Biocarga ou *Bioburden*)

Para se ter uma estimativa da população de microrganismos nas superfícies de equipamentos, áreas, mesas, paredes, frascos de produtos vazios e produtos a granel, deve-se determinar a carga microbiana. No caso de produtos para a saúde, é uma parte importante do processo inicial de validação e parte do controle em processo, como recomendado em normas ISO (Bryans & Alexander, 2011).

Devido a sua natureza, o ensaio para determinação da carga microbiana é inexato, porém o grau de precisão do procedimento do teste pode ser quantificado através do ensaio de recuperação (EN 1174-3, 1996; ISO 11737-1, 2006; Bryans & Alexander, 2011). Pode ser utilizado para o acompanhamento ou para análise de tendências, para a aceitação e aprovação de matérias primas, produtos semi-acabados ou terminados, para avaliar mudanças ou no estabelecimento dos processos de esterilização (Bryans & Alexander, 2011).

Os procedimentos em geral envolvem a extração, cultura e contagem dos microrganismos viáveis, passos que possuem um alto grau de variabilidade. A extração pode não ser completa, dependendo do material que está sendo testado, do meio de cultura utilizado, das condições de incubação, etc. A cultura pode não propiciar o crescimento de alguns microrganismos. Parâmetros adequados devem ser selecionados para o tipo de produto e os níveis e espécies de microrganismos possíveis de contaminá-lo. Os parâmetros a serem considerados são: preparação da amostra, tipo de extração, método de agitação, manipulação do material extraído, meio de cultura a ser semeado e as condições de incubação (Bryans & Alexander, 2011).

Para a realização de estudos de recuperação microbiana, há necessidade de se trabalhar com cepas conhecidas e manter a sua qualidade. Vários métodos de conservação do inóculo estão descritos na literatura, entre eles, liofilização, nitrogê-

nio líquido a -196 °C ou freezer a -40 a -120 °C (Pelczar et al., 1996; Pinto et al., 2010). Outra maneira é se preparar uma suspensão de células padronizada que pode ser usada por uma semana pelo recolhimento das células da cultura de 24 horas em meio inclinado de tubos ou do cultivo do microrganismo em meio de cultura líquido (Pinto et al., 2010).

Na indústria de dispositivos médicos, os produtos a serem testados são geralmente sólidos constituídos de diversos tipos de materiais. Esses produtos podem possuir uma ampla variedade de níveis de contaminantes, ter vários microrganismos associados ao ambiente e não conter conservantes. Estes fatores significam que os testes de recuperação devem ser projetados para extrair os microrganismos das superfícies dos materiais e locais de difícil acesso, para detectar os organismos presentes naturalmente e devem ser adequados para os diversos níveis de carga microbiana (Bryans & Alexander, 2011).

4.4.4 Processos de esterilização

Nos processos esterilizantes industriais, os agentes usados para a inativação de microrganismos são temperatura elevada, radiação ionizante e gases tóxicos. Com frequência, os produtos farmacêuticos não resistem a esses tratamentos sem perda de eficácia (Shalaby & Linden, 1996; Omi, 2000; Pinto et al., 2010). Nesses casos, é utilizada a extração mecânica ou filtração asséptica, onde o manuseio, enchimento e fechamento da apresentação final do produto devem ocorrer em ambiente asséptico (Pinto et al., 2010).

A resistência dos microrganismos à inativação por um agente em particular é afetada por influências ambientais, umidade, temperatura e composição do meio de cultura, por resíduos de matéria orgânica, e, também, por condições observadas durante a formação e crescimento do microrganismo, e durante a sua esporulação. Sendo assim, desenvolvem-se protocolos que empregam cepas referência bem definidas, quando possível na forma esporulada, e que sejam mantidas e utilizadas sob condições padronizadas. Entre as influências ambientais incluem-se pH, força iônica, conteúdo em lipídios, proteínas e carboidratos, além da presença de íons. Na inativação por calor seco e irradiação, o conteúdo de água e a atmosfera são importantes (Pinto et al., 2010).

Na TAB. 1 estão discriminados vários métodos de esterilização e suas carac-

terísticas.

TABELA 1 - Comparação entre métodos de esterilização (Trabulsi & Alterthum, 2008).

Método	Radiação Gama	Óxido de etileno	Vapor	Peróxido de hidrogênio
Formato do produto	Sem restrição	Cavidades abertas	Cavidades abertas	Cavidades abertas
Embalagem do produto	Sem restrição	Permeável, resistente à pressão e vácuo	Permeável, resistente à pressão e vácuo	Permeável, resistente à pressão e vácuo
Parâmetros controlados	Tempo	Concentração, vácuo, temperatura, pressão, umidade, tempo	Vácuo, temperatura, pressão, umidade, tempo	Vácuo, temperatura, pressão, tempo
Confiabilidade do processo	Excelente	Boa	Excelente	Excelente
Teste após esterilização	Dosimetria	Indicador biológico	Indicador paramétrico	Indicador biológico
Período de quarentena	Nenhum	3-14 dias	0-7 dias	Nenhum
Tratamento após esterilização	Nenhum	Aeração	Secagem	Aeração
Custo de investimento inicial	Alto	Médio a alto	Baixo	Médio a alto
Auditoria	Trimestral	Anual	Anual	Anual
Temperatura	Ambiente	Menor que 60 °C	até 132 °C	50 °C
Tempo de exposição	Variável (dose)	3-4 horas 55 °C	15 min 121 °C	75 min
Preço	60-80 dólares/m ³ *	R\$ 760,00/ciclo **	R\$ 68,30/ciclo ***	Similar ao óxido de etileno

* Dose 25 kGy; produto esterilizado na embalagem final (IPEN-CTR, 2013); ** (ACECIL LTDA., 2013); *** (Jericó, 2008).

Esterilização por radiação ionizante

A radiação ionizante emitida por radionuclídeos possui elevado poder de penetração e, ao interagir com os produtos, transfere sua energia através de colisões com os elétrons das órbitas dos átomos que constituem o produto e como resultado desse complexo processo de transferência de energia por efeito Compton, a inativação de um microrganismo pela radiação é ocasionada, em parte, pela colisão direta da radiação com regiões sensíveis da célula e, parcialmente, pela ação indireta, via formação de radicais químicos altamente ativos, produzidos no líquido da célula pela radiação (Sampson, 1990; Pelczar et al., 1996; Oliveira et al., 2006; Pinto et al., 2010). Por exemplo, no caso da ação direta, a radiação ioniza uma parte da molécula

la de DNA, uma enzima ou qualquer componente vital da célula, levando-a a um estado de falência ou inibição da sua reprodução. Por via indireta, a radiação provoca nas moléculas de água presentes nos microrganismos a formação de radicais livres, tais como $\text{OH}^\bullet$ e $\text{H}^\bullet$, e moléculas como H_2O_2 . Essas espécies químicas, sendo altamente reativas, podem interagir com os componentes vitais dos microrganismos, causando indiretamente danos letais (Pelczar et al., 1996; Ahmed, 2007; Trabulsi & Alterthum, 2008; Moeller et al., 2008; Pinto et al., 2010). A morte celular (definida para células proliferativas como perda da capacidade reprodutora) é predominantemente induzida por quebras de cadeias duplas de DNA que não podem ser geralmente reparadas pela célula, e segundo Trampuz et al. (2006) não há muita informação a respeito do efeito da radiação gama no DNA microbiano (Trampuz et al., 2006).

A esterilização por irradiação com raios gama é um método que se caracteriza por baixas temperaturas, permitindo a aplicação em materiais termossensíveis, bem como em dispositivos médicos e materiais de embalagem e acondicionamento, não deixa resíduos, não libera agentes poluentes, não requer quarentena e não torna os produtos radioativos. Apresenta ainda a vantagem de possibilitar a esterilização de produtos previamente embalados de dimensões e densidades variadas (Omi, 2000; Calvo, 2005; ISO 11737-1, 2006; Hammad, 2008; Pinto et al., 2010).

A quantidade de radiação absorvida pelos produtos durante o processo de esterilização por irradiação com raios gama, também chamada de dose, é expressa no Sistema Internacional de Unidades como Gray (Gy), que corresponde à absorção de energia equivalente a um Joule por quilograma de material (ISO 11737-1, 2006; Pinto et al., 2010).

A radiação gama do cobalto-60 (^{60}Co), utilizada em processo industrial, origina-se de transições do núcleo de átomos que estão em nível energético superior e instável passando para um nível de menor energia e estável. O radionuclídeo ^{60}Co é produzido através de uma reação nuclear em que o ^{59}Co que é estável, é bombardeado com nêutrons no interior de um reator, e seu núcleo, ao receber um nêutron, tem o seu número de massa alterado, transformando-se no isótopo ^{60}Co , que é instável e radioativo (Pinto et al., 2010). O ^{60}Co com meia-vida física de 5,261 anos decai por duas possíveis emissões *beta* a níquel-60 (^{60}Ni) estável, com energias de 1,486 e 0,313 MeV, e dois fótons com energias de 1,17 e 1,33 MeV, os quais estão

diretamente relacionados ao processamento dos materiais por radiação nos irradiadores gama (Omi, 2000). Na FIG. 5 está ilustrado o decaimento do ^{60}Co para ^{60}Ni .

FIGURA 5 - Esquema do decaimento do cobalto-60.

(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cobalt-60_Decay_Scheme.svg; Calvo, 2005)

A maneira como os microrganismos são inativados ou destruídos por agentes esterilizantes, segue uma reação mononuclear de primeira ordem, cuja letalidade pode ser representada quando o logaritmo do número de sobreviventes é expresso em função da quantificação do tratamento aplicado (Pinto et al., 2010).

A curva de morte microbiana para um processo de irradiação está representada na FIG. 6, na qual é estabelecida a relação da inativação biológica dos microrganismos em função da quantidade de radiação necessária para se conseguir o efeito desejado para redução da carga microbiana, ou para atingir um nível de segurança de esterilidade igual ou superior a 10^{-6} . A inclinação da curva é uma propriedade inerente do microrganismo sujeito à esterilização e às condições do próprio tratamento de esterilização (Pinto et al., 2010; Bryans & Alexander, 2011).

O valor D (ou D_{10}) apresentado significa a quantidade de radiação necessária a ser absorvida pelo produto, para permitir que a população inicial tenha uma redução de 90%, ou seja, reduzida de uma magnitude na escala logarítmica (ISO 11137-2, 2006; Pinto et al., 2010).

FIGURA 6 - Curva de morte de microrganismo para processo de irradiação (Pinto et al., 2010).

Por causa da natureza da absorção da radiação ionizante, todos os produtos esterilizados em um irradiador gama (^{60}Co) não recebem a mesma dose absorvida. A magnitude da variação de dose é dada como a razão da uniformidade de dose, ou seja, a razão entre a dose máxima e a dose mínima absorvida. Entretanto, como a fração do produto que está recebendo diferentes doses pode variar conforme as condições de irradiação, um produto irradiado com a mesma dose mínima e a mesma razão de uniformidade de dose em diferentes irradiadores, pode ter diferentes níveis de garantia de esterilidade (Chu & Vandyk, 1993; Soliman et al., 2013).

As geometrias de irradiação para um produto ou uma amostra de material devem ser definidas para assegurar que a dose de esterilização foi determinada de forma precisa e o mais uniforme possível (Burg & Shalaby, 1996; ISO 11137-3, 2006; Soliman et al., 2013).

A dosimetria desempenha um papel fundamental na qualificação das instalações de um irradiador gama ou de feixe de elétrons (qualificação de instalação e qualificação de operação), na qualificação do processo e do produto (qualificação de desempenho) e também no monitoramento dos processos de rotina (IAEA, 2013).

Cálculos dosimétricos

Para se estimar as doses em determinadas aplicações podem ser utilizados modelos matemáticos que simulam o transporte de fótons ou elétrons, levando-se em consideração a atenuação e o espalhamento pelo material existente entre a fonte e o produto. São fatores importantes, a distribuição da atividade da fonte, a composição e a posição da fonte e também do produto. Os métodos mais usados para modelagem matemática do transporte de radiação são Point Kernel e Monte Carlo (Zaidi & Sgouros, 2003; ISO 11137-3, 2006).

Dosímetros comerciais utilizados em rotina de esterilização nos processos por irradiação na indústria são fabricados em polimetilmetacrilato (PMMA) e avaliam a uniformidade de dose em produtos com diferentes densidades. Os três tipos principais de dosímetros de rotina fabricados pela empresa inglesa *Harwell Dosimeters Limited*, nas dimensões de 30 x 11 mm, estão discriminados na TAB. 2. Estes dosímetros escurecem ao serem irradiados e a absorbância medida com auxílio de um espectrofotômetro, está associada à dose absorvida pelo dosímetro e, consequentemente, pelo produto processado pela radiação (Calvo, 2005; IAEA, 2013). Na FIG. 7 está ilustrada a relação entre a absorbância e a faixa de dose absorvida. A larga aplicação comercial desses dosímetros é atribuída ao seu baixo custo e facilidade de uso, pois se apresentam embalados individualmente em envelopes feitos com um laminado contendo poliéster, alumínio e polietileno (Omi, 2000).

TABELA 2 - Dosímetros de rotina em PMMA utilizados em processos industriais de irradiação (Calvo, 2005; IAEA, 2013; HARWELL, 2015).

Dosímetros	Espessura Nominal (mm)	Comprimento de Onda (nm)	Incerteza (%)	Faixa de Dose (kGy)
<i>Red Perspex</i> 4034	3,0	640	± 2,0	5 – 50
<i>Amber 3042</i>	3,0	603 e 651	± 2,5	3 - 15
<i>Gammachrome</i> YR®	1,7	530	± 3,0	0,1 – 3,0

FIGURA 7 – Gráfico da relação entre absorvância e faixa de dose dos três tipos de dosímetros utilizados em processos de irradiação (adaptado de HARWELL, 2015).

Chu e Vandyk (1993) avaliaram a eficiência de dois tipos diferentes de irradiadores de ^{60}Co fabricados pela Nordion na esterilização de dispositivos não invasivos (para mucosas e produtos tópicos) e dispositivos invasivos (para fluidos estéreis e implantes cirúrgicos). Foram feitos cálculos de distribuição de dose para dois irradiadores. Utilizando uma carga microbiana de 1000 microrganismos por unidade foi estabelecida a dose de 14,3 kGy para os dispositivos não invasivos e de 24,9 kGy para os dispositivos invasivos. Embora não tenha ocorrido diferença significativa nos resultados obtidos utilizando-se os dois irradiadores para produtos com densidades diferentes, demonstrou-se a importância dos estudos de distribuição de dose para melhorar o nível de garantia de esterilidade (Chu & Vandyk, 1993).

Em um estudo da resistência à radiação de várias espécies de microrganismos presentes na carga microbiana (*bioburden*) de diferentes dispositivos médicos fabricados no Japão, Takehisa et al. (1998) determinaram o *bioburden* por extração, filtração por membrana e incubação das membranas em meio sólido de caseína-soja. De 3742 filtrados, 465 apresentaram crescimento microbiano e essas amostras

foram submetidas a doses crescentes de radiação de ^{60}Co . Observou-se que os isolados de microrganismos de dispositivos “secos” eram mais resistentes do que os dispositivos “úmidos” ou que continham água (Takehisa et al., 1998).

Sabe-se que esporos de bactérias anóxicas são mais sensíveis à radiação quando completamente hidratados, devido à letalidade adicional induzida por produtos de radiólise da água. Os organismos unicelulares são mais resistentes à radiação que os multicelulares. Os esporos bacterianos são os mais resistentes, e as bactérias, na forma vegetativa, particularmente os bacilos Gram (-), as mais sensíveis, enquanto que os bolores e leveduras têm resistência intermediária. Vírus são geralmente mais resistentes à radiação que bactérias. Esporos de *Geobacillus* {*Bacillus*} *stearothermophilus* ATCC (American Type Culture Collection) 7953 e *B. {subtilis}* *atrophaeus* ATCC 9372 são resistentes ao calor, mas não são especialmente resistentes à radiação (Pinto et al., 2010).

Geralmente, os efeitos citotóxicos e mutagênicos induzidos pela radiação ionizante são resultado do dano causado ao DNA bacteriano durante a irradiação, que incluem quebras de cadeias simples, quebras de cadeias duplas, modificações de bases e açúcares. A resistência dos esporos à radiação ionizante tem sido atribuída à quantidade reduzida de água no núcleo do esporo, ao papel protetor das pequenas proteínas tipo α/β solúveis em ácido, à presença de ácido dipicolínico e cátions divalentes como Mn^{2+} e Ca^{2+} e à ocorrência de um sistema específico de reparação do dano ao DNA (Gioia et al., 2007; Moeller et al., 2008; Granger et al., 2011).

Os esporos de *B. pumilus* têm sido usados como indicadores biológicos para esterilização por irradiação com raios gama (Darmady et al., 1961; Parisi & Antoine, 1974; Parisi & Antoine, 1975; Singh et al., 2006; Trabulsi & Alterthum, 2008; Pinto et al., 2010).

Existem outras espécies de bactérias que têm sido estudadas e que são extremamente resistentes à radiação como *Deinococcus radiodurans*, que é uma espécie não patogênica, não forma esporos e é aeróbia restrita (Daly et al., 2004; Krisako & Radman, 2010).

4.4.5 Preparação de esporos e indicadores biológicos

Algumas espécies de bactérias, especialmente do gênero *Bacillus*, entre elas *B. pumilus* e *B. subtilis*, podem produzir esporos quando submetidas a condições

desfavoráveis para o seu crescimento e desenvolvimento. O esporo bacteriano é muito resistente ao calor, à dessecação e a outros agentes químicos e físicos. É capaz de permanecer em estado latente por longos períodos e, em seguida germinar, dando origem a uma nova célula vegetativa. A estrutura do esporo é constituída de uma primeira camada interna, a parede do esporo, que é composta de peptídeoglicano; envolvendo a parede do esporo está o córtex; externamente ao córtex fica a capa do esporo que é uma estrutura rígida composta de proteína rica em ligações dissulfetos. A camada mais externa recebe o nome de exósporo e consiste em uma membrana lipoproteica com aminoaçúcares (Ribeiro & Soares, 2000).

Vários trabalhos relatados na literatura descreveram métodos de obtenção de esporos os quais foram utilizados como indicadores biológicos para esterilização por irradiação.

Pepper et al. (1956) avaliaram a resistência relativa de esporos bacterianos à radiação utilizando suspensões de diversas espécies de bactérias contendo 5×10^5 esporos viáveis por mL. Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para 4 discos de papel de filtro que foram colocados em envelopes de polietileno, hermeticamente fechados e irradiados. Após serem desinfetados quimicamente, os pacotes foram imersos em meio de soja caseína para esporos aeróbios e meio de tioglicolato para esporos anaeróbios. Das 25 espécies estudadas, 24 necessitaram de 10 kGy ou mais para esterilização (Pepper et al., 1956).

Borick & Fogarty (1967) utilizaram discos de celulose de 12,7 mm de diâmetro e $1,3 \text{ cm}^2$ de área como bioindicadores, inoculando cada um com 0,1 mL de uma suspensão de esporos contendo 10^7 a 10^8 esporos mL^{-1} de *Bacillus pumilus*, *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. Foram estudadas condições úmidas e secas para manutenção dos bioindicadores. Discos úmidos foram lacrados hermeticamente em tiras de plástico imediatamente após a contaminação, enquanto que discos secos permaneceram por 72 horas a 37°C e depois selados em tiras de plástico. Após irradiação com 4 níveis diferentes de dose, todos foram submetidos a testes de esterilidade. Vários experimentos foram planejados no estudo de Borick & Fogarty, utilizando dois diferentes materiais como suportes para os esporos: sutura de algodão (*size 1 cotton sutures*, Ethicon Inc.) e ágar. A sutura de algodão foi escolhida pela facilidade na inoculação

com microrganismos e na manutenção da viabilidade dos esporos. As suturas inoculadas com 2×10^4 esporos por sutura foram embrulhadas e seladas uma a uma em folha de alumínio de 3,5 x 7,9 cm. Dosímetros de ágar foram preparados utilizando uma suspensão de esporos de *B. pumilus* em ágar fundido a aproximadamente 46 °C com uma concentração de 10^5 esporos mL⁻¹. Volumes de 5 mL foram pipetados em placas de Petri (100 x 15 mm) da suspensão de ágar-esporos distribuídos uniformemente na superfície da placa, resultando em uma camada de ágar de aproximadamente 0,8 mm de espessura. As placas foram mantidas em refrigeração até que fossem irradiadas. Um dosímetro químico foi colocado com cada dosímetro de ágar para determinação da dose inicial e final. As contagens foram feitas após derreter ágar nutriente (PCA) sobre as suspensões de esporos em ágar irradiado e incubar a 37 °C. Os autores observaram que alguns materiais podem proteger o microrganismo porque a esterilização foi mais difícil nos dosímetros de ágar do que nas suturas (Borick & Fogarty, 1967).

Parisi & Antoine (1975) prepararam esporos de *B. pumilus* inoculando a superfície de placas de TSA com 1 mL de uma cultura de 24 horas em meio de TSB. As placas inoculadas foram incubadas até que a esporulação excedeu 95%, o que normalmente acontece em menos de 7 dias. Os esporos foram recolhidos lavando-se a superfície do ágar com água estéril e deionizada, seguida de mais três lavagens por centrifugação. Os indicadores biológicos foram preparados inoculando-se tiras feitas de suturas de algodão (*size 1 Sutupak Cotton*, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.) com uma suspensão de esporos em álcool isopropílico:água (80:20) para dar uma concentração de 2×10^4 esporos em cada bioindicador. Após a inoculação e secagem ao ar, as tiras foram lacradas por calor. A avaliação quanto ao efeito da radiação por exposição a uma fonte de ⁶⁰Co foi feita por teste de esterilidade. Os pesquisadores também estudaram gradiente de concentração de esporos em indicadores biológicos de papel Whatman n.1 inoculados com 0,1 mL de quantidades variadas de *B. pumilus* em álcool isopropílico:água (80:20) para dar concentrações finais de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 esporos. As amostras expostas a diferentes doses de radiação foram testadas quanto à esterilidade e cepas danificadas foram avaliadas quanto à motilidade e formação de película. Devido à pequena porcentagem de culturas que apresentaram algum dano após irradiação, os autores afirmaram que uma espécie microbiana tem valor como indicador biológico quando pode ser detec-

tada, de forma confiável, após um tratamento ineficaz de esterilização (Parisi & Antoine, 1975).

Prince (1976) estudou a viabilidade e a radiorresistência dos esporos de *B. pumilus* pelo cultivo em placa de TSA por 10 dias a 35 °C, tempo em que houve no mínimo, 90% de esporulação. A cultura foi removida com um bastão de vidro e a massa celular foi lavada três vezes por centrifugação com água estéril e deionizada. A pasta densa foi levada a choque térmico por 15 minutos a 80 °C para eliminar as formas vegetativas, sendo rapidamente resfriada e então congelada até o momento do uso. Contagens de esporos viáveis de suspensões congeladas permaneceram inalteradas após quatro anos a -10 °C (com densidade celular de aproximadamente 10^{10} esporos mL⁻¹). Os carregadores foram preparados diluindo-se a pasta com isopropanol 80% (m/v) e assim as tiras de papel de filtro (40 mm x 8 mm) foram inoculadas com 0,1 mL, seguida da secagem em temperatura ambiente por cinco dias em um dessecador a vácuo com CaCl₂. A recuperação dos esporos foi realizada pela trituração das tiras amolecidas em um almofariz com pistilo, seguida da diluição e contagem de placas de TSA incubadas a 35 °C por 48 horas em duplicata. O valor encontrado de D₁₀ de esporos de *B. pumilus* foi de 0,17 a 0,18 MRad (1,7 a 1,8 kGy) após 1 ano a 5 ou 25 °C (Prince, 1976).

4.4.6 Métodos de esterilização de radiofármacos

No Brasil, a RDC nº 63 que trata das BPF de Radiofármacos estabelece os requisitos mínimos a serem cumpridos na fabricação de radiofármacos e complementa a RDC nº 17 que se refere às BPF de Medicamentos (BRASIL RDC nº 63, 2009; BRASIL RDC nº 17, 2010).

As BPF de Radiofármacos preconizam que radiofármacos injetáveis devem ser estéreis e livres de pirogênio, bem como devem ser preparados sob condições que excluam a contaminação microbiana no produto (Zolle, 2007; BRASIL RDC nº 63, 2009). Os métodos de esterilização usualmente utilizados para radiofármacos envolvem a esterilização final por calor úmido (autoclavação) e a técnica asséptica de filtração por membrana (Saha, 2003; Zolle, 2007). Os radiofármacos que são esterilizados terminalmente apresentam um maior grau de garantia de esterilidade quando comparados aos que foram preparados por técnica asséptica. O teste de

esterilidade é o único método analítico disponível para demonstrar a ausência de contaminação microbiana (Zolle, 2007).

Na autoclavação, o radiofármaco é esterilizado por aquecimento a vapor a 121 °C sob pressão de 18 libras por polegada quadrada (psi) por cerca de 15 a 20 minutos. Este tipo de esterilização é adequado apenas para soluções termoestáveis, ao passo que preparações oleosas e produtos termolábeis como substâncias marcadas com ^{99m}Tc e proteínas marcadas com iodo radioativo não suportam a autoclavação porque as moléculas são danificadas pelo calor (Saha, 2003; Oliveira et al., 2006).

A filtração por membrana é o método mais comum de esterilização em uma radiofarmácia e é o método de escolha para radionuclídeos de meia-vida física curta e radiofármacos termolábeis. Consiste da filtração simples do radiofármaco através de um filtro de membrana que remove os microrganismos por um mecanismo de peneiramento. O tamanho de poro mais comum em filtro de membrana é 0,45 μm , mas o tamanho de poro de 0,22 μm é usado para a esterilização de derivados do sangue e preparações em que há suspeita de contaminação com microrganismos de dimensões menores (Saha, 2003; Oliveira et al., 2006). A verificação da eficácia da filtração é realizada pelo teste de integridade do filtro (Pinto et al., 2010).

4.4.7 Efeitos da contaminação microbiana em geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$

Sorensen et al. (1977) estudaram a contaminação microbiana em geradores exauridos de ^{99m}Tc . Os geradores foram desmontados e a coluna de alumina foi esterilizada por autoclavação antes da contaminação com diferentes cepas de microrganismos. Foram realizados três experimentos: nos experimentos 1 e 2, os geradores foram contaminados com 5 diferentes espécies de microrganismos, sendo que no experimento 1, os geradores foram eluídos (10 mL) imediatamente 9 vezes seguidas, enquanto que no experimento 2, foram eluídos após 1 e 2 semanas. No experimento 3, foram utilizados geradores de 8 fabricantes diferentes cujas colunas foram contaminadas com uma única espécie de microrganismo e esses geradores foram eluídos imediatamente 3 vezes e novamente após 2 semanas. A redução do número de microrganismos no eluato independentemente da espécie de microrganismo e das condições do experimento, foi atribuída à retenção bacteriana pela coluna. O estudo esquematizado na FIG. 8 concluiu que seria vantajoso omitir a auto-

clavação e filtração por membrana do produto acabado, mas que deveriam ser usadas técnicas assépticas incluindo a permanência do gerador em ambiente limpo (Sorensen et al., 1977).

FIGURA 8 – Esquema do experimento de Sorensen et al. (1977).

Allwood e McCarthy (1980) (FIG. 9) pesquisaram o motivo pelo qual no estudo de Sorensen et al. (1977) ocorreu redução da contaminação microbiana no eluato do gerador de ^{99m}Tc . Numa tentativa de separar os efeitos químicos e radiológicos do molibdato de amônio dos efeitos do material da coluna na viabilidade celular, três tipos diferentes de coluna foram usadas: colunas não carregadas com molibdato, colunas com atividade residual de ^{99}Mo menor que 37 Bq (1×10^{-6} mCi), colunas ativas com atividade de 3,7 GBq (100 mCi) no dia do uso. Colunas de geradores foram

contaminadas por eluição com um frasco contendo 15 mL de salina previamente inoculada com 0,1 mL de suspensão de *E. coli* contendo cerca de 10^7 UFC. Para verificar se células viáveis estavam presentes nas colunas após a eluição final, estas foram retiradas do gerador, cuidadosamente abertas e amostras de alumina foram colocadas em 10 mL de cloreto de sódio 0,9%. Cada suspensão foi agitada e a contagem de viáveis determinada. Foram realizadas eluições diárias dos geradores com colunas carregadas e não carregadas. As maiores quantidades de microrganismos viáveis foram eluídas na primeira e segunda eluição e eluições subsequentes removeram números decrescentes. Resultados mostraram que houve uma maior perda de viabilidade nas colunas carregadas. O pirogênio de eluatos de dois geradores intencionalmente contaminados com *E. coli* foi avaliado pelo teste do LAL (*Limulus Amebocyte Lysate Test*). Foi observado que os primeiros eluatos não continham pirogênio, mas entre 6 e 9 dias após a inoculação, ocorreram resultados positivos para endotoxinas bacterianas. Os resultados mostraram que a coluna de alumina pode não só reter microrganismos, mas também reter endotoxina bacteriana (Allwood & McCarthy, 1980).

FIGURA 9 – Esquema do experimento de Allwood & McCarthy (1980).

Petrik et al. (2012) estudaram a sobrevivência de microrganismos em eluatos não radioativos provenientes de outros tipos de geradores de radionuclídeos como o de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, após a introdução de uma carga microbiana significativa e constataram que as condições são desfavoráveis à sobrevivência ou crescimento de microrganismos (Petrik et al., 2012).

4.5 Controle biológico de qualidade

Os testes biológicos verificam a esterilidade, apirogenicidade e a toxicidade dos radiofármacos antes da administração em humanos (Owunwane et al., 1995; Saha, 2003).

4.5.1 Teste de esterilidade

O teste de esterilidade é realizado para provar essencialmente que os radiofármacos estão livres de microrganismos viáveis. Estes testes deverão ser executados de forma asséptica para que bactérias externas não sejam adicionadas às amostras durante o procedimento. O uso de cabine de fluxo laminar e treinamento pessoal são imperativos (Saha, 2003).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (FB) e Americana (USP), os testes de esterilidade devem ser realizados incubando-se a amostra em meio de fluido de tioglicolato a $32,5 \pm 2,5$ °C, e em meio de caseína-soja a $22,5 \pm 2,5$ °C por 14 dias. Se for observado crescimento de microrganismos pela turvação do meio de cultivo, o radiofármaco não se encontra estéril (Saha, 2003; FB 5, 2010; USP 37, 2014).

A principal diferença entre medicamentos não radioativos e preparações radiofarmacêuticas reside no prazo de validade que muitas vezes é de horas ou alguns dias. Devido ao curto tempo de meia-vida física dos radionuclídeos, muitos radiofármacos devem ser produzidos, controlados e administrados num curto espaço de tempo, muitas vezes até no mesmo dia. O cumprimento dos requisitos das BPF é essencial, uma vez que o radiofármaco é administrado sem os resultados prévios, principalmente, dos testes de esterilidade (Oliveira et al., 2006; ANVISA RDC nº 63, 2009; EP 7, 2010).

Segundo a USP, o teste de esterilidade para radiofármacos deve ser executado no máximo até 24 horas após a sua fabricação (USP 37, 2014).

4.5.2 Apirogenicidade e toxicidade

Todos os radiofármacos para administração humana devem ser livres de pirogênio. Pirogênios são polissacarídeos ou proteínas produzidas pelo metabolismo de microrganismos que possuem tamanhos de 0,05 a 1 µm e em geral, são solúveis e termoestáveis. Produtos de origem bacteriana, as chamadas endotoxinas, são os seus principais exemplos, mas várias substâncias químicas também podem atuar

como substâncias pirogênicas (Castiglia et al, 1999; Saha, 2003; Oliveira et al., 2006; Fukumori, 2008).

A presença de pirogênio em um indivíduo pode ocasionar diversos sintomas como febre, calafrio, mal estar, leucopenia, dores nas articulações, rubor, sudorese, dor de cabeça e dilatação das pupilas. Reações pirogênicas podem se manifestar de 30 minutos a 2 horas após a injeção (Castiglia et al., 1999; Saha, 2003).

A esterilidade de um radiofármaco não garante que ele esteja livre de pirogênio (Oliveira et al., 2006; Fukumori, 2008).

Os métodos usuais para a determinação de pirogênio são o método *in vivo* que utiliza coelhos e o método *in vitro* que usa o lisado dos amebócitos de *Limulus polyphemus* (LAL), oficialmente conhecido como teste de endotoxinas bacterianas (Owunwane et al., 1995; Castiglia et al, 1999). O método *in vitro* é um teste rápido, sensível e específico para detectar e avaliar a presença de endotoxina bacteriana proveniente de bactérias Gram negativas, pela reação de gelificação do lisado de amebócitos do *Limulus* com pequenas quantidades de endotoxina (Castiglia et al, 1999; Fukumori, 2011). Para radiofármacos, os testes de endotoxina bacteriana devem ser iniciados logo após a fabricação (EP 7, 2010; USP 37, 2014).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos para esterilização por irradiação com raios gama (^{60}Co) foram realizados no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) e montagem dos sistemas dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ realizada nas áreas de produção e controle de qualidade do Centro de Radiofarmácia (CR), ambos no IPEN-CNEN/SP. Os testes microbiológicos foram executados nos laboratórios de controle de qualidade, compreendendo a operação e utilização dos equipamentos disponíveis, tratamento de dados para o estabelecimento das condições efetivas para esterilização dos materiais, execução dos ensaios com microrganismos e de controle microbiológico, bem como dos demais ensaios.

5.1 Materiais e equipamentos

5.1.1 Materiais

- ❖ **Sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$** - Colunas cromatográficas de vidro recheadas com alumina (Al_2O_3) e Teflon[®] montadas pela empresa Forthmed (Campinas – SP) com tecnologia IPEN, e acessórios (tampa do gerador, mangueiras, tampas batoques, filtros, sistema de lavagem) para gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, mostrados na FIG. 10.

FIGURA 10 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ em corte longitudinal.

Na FIG. 10 estão discriminados os materiais que compõem o conjunto da tampa do gerador (números 1 a 4, 17, 18), conjunto da coluna de alumina – Al_2O_3 (números 8, 10, 11, 14, 15 e 16) que é esterilizado por autoclavação, bem como mangueiras de PVC e silicone que são esterilizados por radiação gama.

A sequência da montagem de uma coluna de vidro com alumina, Teflon[®], tampa batoque superior e tampa batoque inferior está mostrada na FIG. 11.

(Fonte Forthmed)

FIGURA 11 – Sequência de montagem da coluna do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

- ❖ Cepas padrão de *Bacillus pumilus* ATCC[®] 14884, marca Microbiologics[®], Estados Unidos da América (EUA); *Bacillus subtilis* NCTC[®] 10400, marca Biomérieux, França; *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC[®] 6633 Epower (4,9 x 10⁶ UFC por *pellet*), marca Microbiologics[®], EUA;
- ❖ ^{99}Mo fornecido pelos fabricantes: NTP Radioisotopes SOC Ltd (África do Sul), CNEA – Comisión Nacional de Energía Atómica (Argentina) e NORDION (Canadá), que após recebimento, diluição e fracionamento em vários frascos foi esterilizado por autoclavação. Por questões de praticidade e histórico de uso nos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, as unidades de atividade estão expressas em mCi e μCi ;
- ❖ Frascos de cloreto de sódio 0,9% 6 mL, frascos em vácuo, frascos com solução bacteriostática para a eluição do gerador;

- ❖ Meios de cultura de Tioglicolato e de Caseína-soja (TSB), marca Plastlabor (tubos de 9 mL) e Merck-Millipore (frascos de 100 mL);
- ❖ Meio de cultura PCA (*Plate Count Agar*) para contagem em profundidade, marca Plastlabor (frascos com 200 mL);
- ❖ Placas com meio de cultura Trypticase (TSA), marca Plastlabor;
- ❖ Placas de Petri vazias estéreis;
- ❖ Reagentes para coloração de Gram, marca Merck, Alemanha;
- ❖ Corante verde malaquita, marca Synth, Brasil;
- ❖ Reagente de LAL, padrão de endotoxina bacteriana, água estéril e livre de pirogênio, tubos de vidro estéreis e apirogênicos com tampa, marca Endosafe, Charles River Laboratories, EUA;
- ❖ Pipetas graduadas de 2 mL e 10 mL, micropipetas e ponteiros descartáveis de 5 mL, 1 mL e 0,1 mL;
- ❖ Alças bacteriológicas; e
- ❖ Tubos de ensaio esterilizados por autoclavação.

5.1.2 Equipamentos

- Analisador termogravimétrico, modelo TGA-50, marca Shimadzu; DSC 6000 Calorímetro por escaneamento diferencial, modelo SDT Q600, marca Perkin Elmer, do Laboratório de Análise Térmica e Irradiador Multipropósito de Cobalto (^{60}Co) do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR), do IPEN-CNEN/SP;
- RIGAKU, modelo Multiflex para difração de raios X; TABLETOP MICROSCOPE, modelo TM-3000, marca Hitachi, que combina microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva (EDS) do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM), do IPEN-CNEN/SP;
- Câmara de ionização modelo CRC-35R, marca Capintec;
- Banho-maria a 37 ± 1 °C para incubação das amostras-teste para a determinação de endotoxina bacteriana, marca Eletrolab;

- Sistema de filtração Milliflex, marca Millipore, para determinação de carga microbiana;
- Cabine de Fluxo Laminar, marca Trox;
- Estufas a $32,5 \pm 2,5$ °C, e a $22,5 \pm 2,5$ °C para incubação dos meios de cultura, marca Quimis e Nova Ética;
- Refrigerador e freezer Duplex para conservação dos meios de cultura preparados ($2-8$ °C) e cepas de microrganismos -20 ± 5 °C, marca SANYO;
- Agitador Vórtex, modelo Genius 3, marca IKA;
- Microcentrífuga, modelo MIKRO 220R, marca Hettich;
- Contador de colônias, marca QUIMIS;
- Microscópio óptico com câmera digital e programa de tratamento de imagem, marca Motic;
- ICP-OES, modelo Vista-MPX, marca Agilent; e
- Espectrofotômetro UV-Vis, modelo U-2010, marca Hitachi.

5.2. Métodos

5.2.1 Determinação da carga microbiana e avaliação dos efeitos das doses de radiação em acessórios de gerador e colunas de alumina

A carga microbiana dos acessórios de gerador (tampas do gerador com filtro, tampas batoques e sistema de lavagem) e colunas de alumina foi avaliada no Laboratório do Centro de Qualidade Analítica (CQA) - Campinas, antes da esterilização por radiação gama (^{60}Co). Foram determinadas as doses de verificação e de esterilização para cada um dos materiais (ISO 11137-2, 2006).

Três lotes de cada tipo de acessório foram irradiados com raios gama (^{60}Co , energia de 1,486 e 0,313 MeV), nas doses absorvidas de 15, 25 e 50 kGy para estudos de estabilidade mês a mês, no período de 6 meses, e examinados quanto aos parâmetros de cor, elasticidade/flexibilidade, conexão e encaixe. Os materiais não irradiados também foram avaliados e denominados como “controle”.

Para confirmação da dose aplicada à coluna do gerador no Irradiador Multipropósito de ^{60}Co do CTR, foram posicionados dosímetros de polimetilmetacrilato (PMMA – Red Perspex) no interior das colunas de vidro vazias expostas às doses de 10 e 25 kGy. Para as doses de 10, 15, 25 e 50 kGy na coluna, avaliaram-se: alterações devido à ação da radiação gama na coluna de vidro; na estrutura cristalina da alumina por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise elementar por EDS, e também por difração de raios X; no Teflon® por TGA e DSC; alterações visuais e resistência mecânica dos acessórios para gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$; medida do tempo e volume de eluição em sistemas “frios” montados para eluição de geradores, além de esterilidade, pirogênio, pH, teor de Al (valor especificado menor do que $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme farmacopeia europeia) e Mo nos eluatos (FIG. 12).

FIGURA 12 – Fluxograma dos ensaios para verificação do efeito da radiação gama (10, 15, 25 e 50 kGy) em acessórios de gerador e colunas de alumina.

As amostras de alumina controle (não irradiadas) e irradiadas, todas de um mesmo lote de fabricação, foram submetidas à análise estrutural pelo uso combinado de MEV e de EDS. As amostras de Teflon® foram avaliadas por TGA-50 (FIG. 13) para se verificar a variação de massa em função da temperatura ou do tempo, e por DSC 6000 (FIG. 14) que fornece medidas simultâneas das alterações da massa e do fluxo de calor diferencial.

FIGURA 13 - Analisador termogravimétrico TGA-50, marca Shimadzu.

FIGURA 14 - DSC 6000, modelo SDT Q600, marca Perkin Elmer.

5.2.2 Avaliação das colunas de alumina irradiadas

a) Dez unidades de cada um de três lotes diferentes de colunas irradiadas foram submetidas à montagem do gerador para avaliação do desempenho de eluição a cada mês, durante 6 meses. Os parâmetros para o teste de eluição foram: tempo

de eluição de 30 a 50 segundos e volume eluído de 5,5 a 6,5 mL. Foram observados: alteração de cor, aparecimento de trincas e/ou manchas, alteração no Teflon® e na placa de vidro sinterizado; verificação de sulcos ou rachaduras no corpo da alumina;

b) Elaboração de cálculos dosimétricos simulando a dose absorvida proveniente do ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ presentes nas colunas do gerador nas atividades de 9,25 GBq (250 mCi) e 74 GBq (2.000 mCi);

c) Avaliação do perfil e rendimento de eluição, atividade de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, pH, teor de alumínio no eluato, testes de esterilidade por inoculação direta em meios de cultura e de endotoxina bacteriana durante duas semanas ou 10 eluições; e

d) Avaliação da recuperação microbiana nos eluatos dos geradores montados com as colunas esterilizadas por radiação gama (“branco”), inoculando-se cepas padrão ($10^2 - 10^8$ UFC) nas colunas de alumina.

As etapas estão representadas no fluxograma da FIG. 15.

FIGURA 15 – Fluxograma dos ensaios para avaliação das colunas de alumina irradiadas com raios gama, após montagem do gerador.

5.2.3 Avaliação da eficácia da radiação gama na morte de microrganismos

Para os geradores de atividade mínima (9,25 GBq) e máxima (74 GBq), os microrganismos quantificados *B. pumilus* ou *B. subtilis* foram posicionados de duas maneiras: a) inoculados diretamente nas colunas antes da dispensação de diferentes atividades de ⁹⁹Mo (FIG. 16a); e b) em suportes na região externa à coluna, mas

no interior da blindagem do gerador (FIG. 16b). Nos dois casos, foi avaliada a recuperação microbiana.

FIGURA 16 – Corte longitudinal da coluna de alumina do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ mostrando a posição de inoculação de microrganismos (a) dentro e (b) fora da coluna.

5.2.3.1 Preparação e quantificação de *Bacillus subtilis* NCTC[®] 10400 e *Bacillus pumilus* ATCC[®] 14884

Preparação de suspensão de *B. subtilis* e obtenção de curva padrão

A suspensão de *B. subtilis* NCTC[®] 10400 foi preparada a partir de uma cultura mãe de 5ª passagem, transferindo-se uma pequena porção com alça bacteriológica para uma placa de TSA e incubando-a a 32 °C por 24 horas. Utilizaram-se duas porções de 4 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9% para extrair o microrganismo. A partir da suspensão coletada, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} , procedendo-se à semeadura em profundidade (*pour-plate*) em duplicata para cada diluição. Após três dias de incubação a 32 °C foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC). As placas com diluições que apresentaram faixa de contagem entre 30-300 UFC por placa foram consideradas para o cálculo de quantificação (Norrell & Messley, 1997). A FIG. 17 mostra o esquema de como são feitas as diluições seriadas e o plaqueamento em profundidade.

A curva padrão para quantificar o *B. subtilis* foi feita com diluições sucessivas de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128, a partir da suspensão extraída da placa, e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 580 nm (FB 5, 2010).

MO = microrganismo

FIGURA 17 – Diluições seriadas para plaqueamento em profundidade (adaptada de https://learning.uonbi.ac.ke/courses/SBT202/scormPackages/path_2/1423_pour_plate.html; Pinto et al., 2010).

Carregamento da coluna de gerador com *B. subtilis* para estudo de recuperação microbiana

Montou-se um sistema do gerador com coluna irradiada com dose absorvida de 25 kGy, dispensando-se 1 mL de suspensão quantificada de *B. subtilis*. Foi utilizado um conjunto de tampa sem os filtros esterilizantes. Procedeu-se a uma eluição 18 horas e outra 24 horas para avaliação da recuperação microbiana em dois tempos diferentes após o carregamento com microrganismos.

A partir de cada eluato, três diluições subsequentes de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram feitas e para cada diluição foram incubadas, em triplicata, amostras de 1 mL em 9 mL de meio de cultura de TSB a 32 °C por 3 dias, para quantificação pela técnica dos tubos múltiplos ou Número Mais Provável (NMP) (FB 5, 2010; USP 37, 2014).

Preparação de esporos de *B. pumilus* e obtenção de curva padrão

Os esporos de *B. pumilus* ATCC® 14884 foram preparados segundo as etapas mostradas na FIG. 18 (Parisi & Antoine, 1975; Prince, 1976).

FIGURA 18 – Etapas de preparação dos esporos de *B. pumilus*.

A curva padrão para quantificar o *B. pumilus* foi feita com diluições sucessivas de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 e a leitura das absorbâncias em 580 nm.

5.2.3.2 Montagem de coluna com molibdênio “frio” e adição de microrganismos

A duas colunas de alumina submetidas a 25 kGy foram adicionados 200-500 µL de uma solução de molibdato de sódio, pH 1,5, correspondente a 10 mg de Mo, e microrganismos, *B. subtilis* ou *B. pumilus*, com cerca de 10^6 - 10^9 UFC mL⁻¹. Foi montado o sistema do gerador e foram realizados procedimentos distintos de eluição para avaliar diferenças nos resultados de recuperação microbiana:

Para *B. subtilis*: 10 eluições sucessivas com 6 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%. De cada frasco eluído, foi retirado 1 mL, totalizando um volume de 10 mL. Procedeu-se à diluição seriada e semeadura por *pour-plate*, em duplicata de todas as amostras.

Para *B. pumilus*:

- Eluição com 6 mL de cloreto de sódio 0,9% em um dia e 6 mL de cloreto de sódio 0,9% em outro dia (após 24 horas); e
- Em outra coluna, 10 eluições sucessivas com 6 mL de cloreto de sódio 0,9% no mesmo dia e todo o conteúdo foi homogeneizado. Procedeu-se à diluição seriada e placas *pour-plate* em duplicata de todas as amostras.

5.2.3.3 Montagem de coluna com ^{99}Mo (atividade nominal de 9,25 GBq ou 74 GBq) e adição de microrganismos

Em duas colunas de alumina esterilizadas a 25 kGy foram dispensados 500 μL com cerca de 10^5 - 10^8 UFC mL^{-1} de suspensão diluída de formas vegetativas de *B. subtilis* ou esporos de *B. pumilus*, sendo uma delas a coluna chamada de controle e a outra foi carregada com cerca de 9,25 GBq ou 74 GBq de ^{99}Mo na forma de $^{99}\text{MoO}_4^-$.

Nos dois casos foram feitas eluições diárias, durante 5 dias, com 6 mL de cloreto de sódio 0,9% em cada eluição. No 5º dia, após a eluição com 6 mL foram realizadas dez eluições sucessivas com 10 frascos de 6 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%. De cada frasco foi retirado 1 mL para outro frasco e o conteúdo foi homogeneizado (este eluato foi chamado de “exaustivo”) e semeado da mesma maneira descrita anteriormente, tanto para o gerador carregado com $^{99}\text{MoO}_4^-$ como para o controle. Todos os eluatos foram diluídos na ordem de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , e 1 mL dos eluatos não diluídos e de cada diluição foram dispensados em placas de Petri em duplicata, e adicionados 15-20 mL de meio *Plate Count Agar* (PCA) para quantificação por *pour-plate*. Após três dias de incubação a 32 °C foi feita a contagem em unidades formadoras de colônia (UFC). A quantidade de microrganismos nos eluatos foi estimada considerando a contagem média (dentro da faixa de trabalho de 30-300 UFC) da duplicata, a respectiva diluição, o valor médio das contagens

por diluição e o volume de eluição (6 mL ou 60 mL). A porcentagem de recuperação foi calculada pela relação entre o total de UFC recuperado durante os cinco dias mais a eluição exaustiva e a quantidade de UFC do inóculo inicial.

5.2.3.4 Preparação do indicador biológico e quantificação de *B. pumilus*

Como suporte para o indicador biológico foi utilizada uma placa de alumínio revestida de sílica gel, conhecida comercialmente como TLC-SG (*Thin Layer Chromatography – Silica Gel*), cortada em tiras de 4,7 x 0,5 cm, com sulcos na sílica a cada 1 cm totalizando quatro segmentos (FIG. 19). Na FIG. 20 é mostrado o fluxo-grama da preparação e quantificação do indicador biológico de *B. pumilus*.

FIGURA 19 – Esquema e foto do indicador biológico de *B. pumilus*.

FIGURA 20 – Preparação e quantificação do indicador biológico de *B. pumilus*.

5.2.3.5 Montagem de gerador de 9,25 GBq e de 74 GBq com indicador de *B. pumilus*

Dois indicadores de esporos de *B. pumilus* com aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC mL⁻¹ foram preparados, encapados com papel manteiga, um chamado de controle e outro para colocação em gerador de 9,25 GBq (FIG.16b). O mesmo procedimento foi utilizado para um gerador de 74 GBq. Foram realizadas eluições diárias, por 5 dias, com 6 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9% no gerador com atividade radioativa. No sexto dia, os dois bioindicadores foram retirados e desembrulhados. Cada segmento foi cortado e lavado com 1 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%. As diluições de 10^{-4} e 10^{-5} de cada lavado foram utilizadas para calcular a recuperação microbiana em cada segmento após exposição à radioatividade da coluna.

5.2.3.6 Montagem de dois geradores de 9,25 GBq com filtros 0,22 µm e Sep-Pak® e colunas inoculadas com *B. subtilis*

Duas colunas de alumina esterilizadas por autoclavação e inoculadas com 10^6 UFC de *B. subtilis* foram utilizadas na montagem de dois geradores de 9,25 GBq com tampas com filtro de 0,22 µm e Sep-Pak® para avaliar se os filtros constituem barreira eficiente à passagem dos microrganismos, evitando assim a contaminação do eluato. A atividade de 9,25 GBq foi escolhida para este experimento por se tratar de gerador com a mais baixa atividade radioativa comercializada pelo IPEN-CNEN/SP.

O inóculo foi preparado conforme indicado pelo fabricante *Microbiologics*, adicionando-se 2 *pellets* de $4,9 \times 10^6$ UFC a 1,5 mL de tampão fosfato pH 7,2. A mistura foi aquecida por 30 minutos a 36 °C, homogeneizada em vórtex e dispensada em alíquotas de 0,5 mL em duas colunas para gerador.

Após o carregamento com ^{99}Mo foi feita a lavagem de cada coluna de alumina com 25 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%, recolhendo-se as soluções de lavagem de cada gerador. As atividades radioativas foram medidas e realizados teste de esterilidade por inoculação direta em meios de cultura de Tioglicolato e TSB e determinação do teor de alumínio. Em seguida, as tampas dos geradores com Sep-Pak® e filtro 0,22 µm foram colocadas, compondo o sistema do gerador. Os primeiros eluatos de cada gerador tiveram suas atividades radioativas medidas e foram avaliados quanto à esterilidade e teor de alumínio.

Os geradores foram eluídos diariamente por 5 dias, e foram determinados: atividade de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, teor de alumínio, esterilidade e endotoxina bacteriana.

Após cerca de 40 dias, os dois geradores foram desmontados sob fluxo laminar e as colunas de alumina e os filtros foram incubados separadamente por 14 dias em meio de cultura de TSB a 32 °C.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação de carga microbiana

O sistema do gerador é composto de diversas partes com características diferentes o que implica em uma variabilidade de tipos e níveis de carga microbiana ou *bioburden*. O número de amostras foi adaptado conforme documento da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) para irradiação de tecidos biológicos para um total de 20 (vinte) unidades (10 para *bioburden* e 10 para dose de verificação) (IAEA, 2007). A dose de verificação foi determinada conforme a ISO 11137-2:2006, Método 1, Nível de Garantia de Esterilidade (em inglês, SAL ou *Sterility Assurance Level*) de 10^{-2} , considerando-se o resultado de carga microbiana obtido (ISO 11137-2, 2006).

Cada um dos materiais (tampas do gerador com filtro, tampas batoque, sistema de lavagem e colunas de alumina) foi irradiado dentro de embalagens prontas para o uso como mostra a FIG. 21.

Na TAB. 3 estão discriminados os resultados de carga microbiana obtidos para cada lote amostrado com as características macroscópicas das colônias de microrganismos.

FIGURA 21 – Materiais do sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$: a) conjunto de tampa externa do gerador; b) tampa batoque superior; c) tampa batoque inferior; d) colunas de gerador; e) sistema de lavagem do gerador.

TABELA 3 – Resultados da carga microbiana dos materiais.

Material	Lote	Carga microbiana (UFC)	Caracterização
Tampa gerador com filtro Sep-Pak®	TS 12030A	190	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias brancas, pequenas e com aspecto leitoso, cocos gram positivos Fungos: bolor negro com aspecto aveludado e bordas irregulares
	TS 12031A	390	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias brancas, pequenas e com aspecto leitoso, cocos gram positivos Fungos: bolores brancos, médios e aspecto aveludado Leveduras: colônias pequenas, leitosas e brancas
	TS 12032A	39	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias amarelas e brancas, pequenas e com aspecto leitoso, Bacilos e cocos gram positivos Fungos: colônias amarelas, pequenas e aspecto leitoso Leveduras: colônias brancas, aveludadas e formato irregular
Tampa gerador sem filtro Sep-Pak®	TM12006A	22	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias médias brancas com bordas irregulares e aspecto leitoso. Fungos: colônia média, negra e com bordas irregulares.
	TM 12007A	2,3	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias grandes, brancas, com bordas irregulares e com aspecto leitoso
	TM 12008A	13	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias médias amarelas, com bordas irregulares e com aspecto leitoso. Fungos: bolores negros e grandes.
Tampa batoque superior	BS 12003A	16	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias amarelas, pequenas e com aspecto leitoso, Bacilos gram positivos Fungos: bolores com colônias brancas, grandes e aspecto aveludado
	BS 12004A	16	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias amarelas e com aspecto leitoso e colônias marrons, grandes e bordas irregulares, gram positivos Fungos: colônias brancas, pequenas e com bordas irregulares. Aspecto de algodão
	BS 12005A	31	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias amarelas, pequenas e com aspecto leitoso, cocos gram positivos Fungos: bolores brancos, médio e com aspecto de algodão
Tampa batoque superior com Teflon®	BT 12001A	190	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias brancas e amarelas, pequenas e com aspecto leitoso, cocos gram positivos Fungos: bolores brancos, pequenos. Aspecto aveludado
	BT 12002A	25	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias brancas e amarelas, pequenas e com aspecto leitoso, cocos gram positivos Fungos: colônias grandes com bordas irregulares. Brancas e com aspecto de algodão
	BT 12003A	20	<ul style="list-style-type: none"> Bactérias: colônias marrons e amarelas, pequenas e com aspecto leitoso, Bacilos gram positivos Fungos: bolores com colônias brancas, médias e com aspecto de algodão

TABELA 3 – Resultados da carga microbiana dos materiais (continuação).

Material	Lote	Carga microbiana (UFC)	Caracterização
Tampa batoque inferior	BI 12002A	<1	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve crescimento microbiano
	BI 12003A	<1	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve crescimento microbiano
	BI 12004A	<1	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve crescimento microbiano
Coluna gerador	CL12015A	2,3	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérias: colônias médias, brancas e com aspecto leitoso. Cocos gram positivos • Fungos: bolor branco, médio com aspecto de algodão. • Leveduras: colônias brancas, médias e aspecto leitoso
	CL12016A	3,5	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérias: colônias pequenas, brancas e com aspecto leitoso. Cocos gram positivos
	CL12017A	53	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérias: colônias médias, brancas e com aspecto leitoso. Bacilos gram positivos • Fungo: bolores negros, médios e aspecto leitoso
Sistema lavagem do gerador	CJ 12002A	160	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérias: colônias brancas, pequenas e com aspecto leitoso • Fungos: bolores negros, médios e com aspecto aveludado • Leveduras: colônias brancas, pequenas e com aspecto leitoso
	CJ 12003A	7,0	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérias: colônias brancas, médias e com aspecto leitoso. Bacilos gram positivos • Fungos: bolores brancos médios, com aspecto de algodão
	CJ 12004A	3,5	<ul style="list-style-type: none"> • Bactérias: colônias alaranjadas, médias, com aspecto leitoso e bordas irregulares. Bacilos gram positivos.

Os resultados mostraram um índice de contaminação maior na Tampa do gerador com filtro Sep-Pak® (390 UFC), na Tampa batoque superior com Teflon® (190 UFC) e no Sistema de lavagem do gerador (160 UFC).

Para se determinar a dose de verificação para cada produto, conforme a ISO 11.137-2:2006, Método 1, deve-se consultar a Tabela 5 dessa norma, considerando-se Nível de Garantia de Esterilidade (em inglês, SAL ou *Sterility Assurance Level*) de 10^{-2} e 10^{-6} conforme os resultados obtidos de carga microbiana.

Na TAB. 4 é apresentada parte da tabela que foi consultada na norma (ISO 11137-2, 2006).

TABELA 4 – Dose de radiação (kGy) necessária para se obter um determinado *s* para carga microbiana $\geq 1,0$, considerando uma distribuição normal de resistência microbiana (ISO 11137-2:2006).

Carga microbiana média (UFC)	Nível de garantia de esterilidade (<i>s</i>)				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	3,0	5,2	8,0	11,0	14,2
21	6,0	8,8	11,9	15,2	18,7
22	6,1	9,0	12,1	15,4	18,8
53	7,2	10,2	13,4	16,7	20,3
160	8,5	11,6	14,9	18,3	21,9
190	8,8	11,9	15,1	18,6	22,2
390	9,7	12,9	16,2	19,8	23,4

Na TAB. 5 estão relacionados os valores médios de carga microbiana para cada um dos materiais avaliados e as doses de verificação e esterilização respectivas. Quando o valor médio de carga microbiana de qualquer um dos lotes individuais foi duas ou mais vezes maior que a média geral, utilizou-se o maior valor. Se cada

uma das médias foi menor do que 2 vezes a média geral, utilizou-se o valor da média geral (ISO 11137-2, 2006).

TABELA 5 – Resultados de carga microbiana (UFC) e as doses de verificação ($s = 10^{-2}$) e de esterilização ($s = 10^{-6}$) correspondentes (ISO 11137-2, 2006).

Material	Carga microbiana (UFC)	Dose de verificação (kGy) para $s = 10^{-2}$	Dose de esterilização (kGy) para $s = 10^{-6}$
Tampa gerador com filtro Sep-Pak [®]	390	9,7	23,4
Tampa gerador sem filtro Sep-Pak [®]	22	6,1	18,8
Tampa batoque superior	21	6,0	18,7
Tampa batoque superior com Teflon [®]	190	8,8	22,2
Tampa batoque inferior	1	3,0	14,2
Coluna de gerador	53	7,2	20,3
Sistema de lavagem do gerador	160	8,5	21,9

Na TAB. 5 está discriminada a dose de radiação (kGy) necessária para atender um Nível de Garantia de Esterilidade ($s = 10^{-2}$) para uma carga microbiana média ≥ 1 . Observou-se que, para Tampa de gerador com filtro Sep-Pak[®], Tampa de gerador sem filtro Sep-Pak[®], Tampa batoque superior com Teflon[®], Coluna de gerador e Sistema de lavagem do gerador, os valores médios de carga microbiana encontrados para cada lote de produto mostraram uma variação significativa entre si. Dessa forma, utilizou-se o maior valor médio de um lote individual para a determinação da dose de verificação. Para carga microbiana média < 1 , foi considerado o valor correspondente a 1. Analisando-se os resultados obtidos, pode-se estimar uma dose de verificação aproximada de 10 kGy para todos os itens avaliados. Assim também, a dose de esterilização ($s = 10^{-6}$) foi aproximada para 25 kGy.

6.2 Avaliação dos efeitos das doses de radiação gama e desempenho dos acessórios que compõem o sistema do gerador

Na TAB. 6 estão apresentados os resultados dos ensaios realizados em acessórios que compõem o gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ no período de 6 meses de estabilidade (início + 6 meses) após irradiação com raios gama (^{60}Co), nas doses absorvidas de 15, 25 e 50 kGy.

TABELA 6 – Verificação dos efeitos e desempenho dos acessórios para gerador durante o período de seis meses.

Material	Cor	Elasticidade/flexibilidade	Conexão	Encaixe
Conjunto tampa externa do gerador (corpo e tampa dos copos)	Sem alteração	Sem alteração	Não aplicável	Não aplicável
Conjunto tampa externa com mangueiras	Escurecimento das mangueiras de PVC	Leve redução da elasticidade das mangueiras de silicone	Mangueira de silicone soltou-se da cânula de aço inoxidável em 25 e 50 kGy	Encaixe frouxo de algumas mangueiras de silicone e discreta dificuldade de encaixe das mangueiras de PVC em 50 kGy
Conjunto tampa externa com filtro	Escurecimento do filtro que aumentou com a dose	Sem alteração	Sem alteração	Tempo de eluição menor para 25 e 50 kGy
Tampa batoque superior	Escurecimento que aumentou com a dose	Redução que aumentou com a dose	Fechamento com leve dificuldade no encaixe à coluna em 25 e 50 kGy	Sem alteração na vedação
Tampa batoque inferior	Escurecimento que aumentou com a dose – presença de manchas em 25 e 50 kGy	Redução leve	Fechamento com dificuldade no encaixe à coluna em 25 e 50 kGy	Sem alteração na vedação
Sistema de lavagem	Escurecimento da mangueira de PVC	Redução leve das mangueiras de silicone	Sem alteração	Sem alteração

A influência da radiação nas propriedades e no desempenho de um dado polímero é variável; o material pode degradar (quebra de cadeia polimérica = *chain scission*) ou formar ligações cruzadas (*crosslinking*) (Burg & Shalaby, 1996; Hemmerich, 2000). Um efeito indesejável comum resultante da irradiação de alguns polímeros é a alteração de cor, geralmente amarelamento, pelo desenvolvimento de cromóforos específicos ou de centros de cor no polímero (Hemmerich, 2000). A faixa de doses na qual o material polimérico irá manter as propriedades desejáveis depende muito da sua estrutura química e também da presença de certos aditivos que podem ajudar a prevenir o dano pela radiação (Hemmerich, 2000).

O silicone, presente nas mangueiras sob a ação da radiação gama pode sofrer alterações (com prevalência de reações de *crosslinking*) com o aumento na massa molar e uma diminuição na elasticidade (Gautriaud et al., 2009).

6.3 Avaliação das colunas irradiadas com doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy

Colunas de alumina não esterilizadas por autoclavação foram irradiadas nas doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, com taxa de dose de 10 kGy h^{-1} . Em duas colunas de vidro vazias foram posicionados dosímetros do tipo *Red Perspex Harwell* para estudo da dosimetria nas doses absorvidas de 10 e 25 kGy respectivamente, conforme mostrado na FIG. 22, para verificar a uniformidade de dose.

Os resultados obtidos para os dosímetros foram:

Dosímetro 1 – dose 10 kGy – tempo de irradiação = 1 hora

A. 10,157 kGy

B. 9,844 kGy

Média = 10,0 kGy

Dosímetro 2 – dose 25 kGy – tempo de irradiação = 2 horas

A. 25,192 kGy

B. 24,796 kGy

Média = 25,0 kGy

onde A é a parte superior do dosímetro e B é a parte inferior do dosímetro.

FIGURA 22 – Posicionamento do dosímetro do tipo *Red Perspex Harwell* no interior da coluna de vidro, onde A é a parte superior e B a parte inferior do dosímetro.

Foi construída uma curva de calibração de dose absorvida (D) do dosímetro do tipo *Red Perspex 4034* (lote KZ), mostrada na FIG. 23, na qual as absorvâncias específicas (K) foram medidas em 640 nm, após o término da irradiação. A Equação 1, polinomial de quarta ordem (método dos mínimos quadrados e confiabilidade de 95%) descreve a relação entre a dose absorvida e a absorvância:

$$D = 14,33083 - 36,03819K + 40,1219K^2 - 14,66032K^3 + 2,02932K^4 \quad (1)$$

Aplicando-se a Equação 1, as doses absorvidas (D) nos dois dosímetros posicionados como controle das doses aplicadas às colunas, puderam ser calculadas, indicando uma boa uniformidade de dose com valores médios de 10 e 25 kGy.

FIGURA 23 - Curva de calibração para determinação de dose (D) em dosímetros do tipo *Red Perspex 4034* (lote KZ). As absorbâncias específicas (K) foram medidas em 640 nm.

6.3.1 Avaliação visual das colunas de vidro irradiadas

Na FIG. 24 estão apresentadas as diferenças na aparência (cor) das colunas de alumina não irradiadas e das colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy.

FIGURA 24 – Colunas de vidro não irradiadas e irradiadas com diferentes doses absorvidas.

O vidro é um líquido de viscosidade muito alta, não tem estrutura cristalina e quando exposto à radiação, um elétron é deslocado ficando aprisionado em vacâncias e formando um centro de cor que absorve a luz (Nassau, 1983; Nassau, 1984; Zumdahl, 1995). O vidro da coluna para gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é de borossilicato (Pyrex[®]) com composição aproximada de 81% de SiO_2 , 3,5% de Na_2O , 2,5% de Al_2O_3 e 13% de B_2O_3 , resistente a choques térmicos e ataques químicos (Callister Jr, 2002). Observou-se que com o aumento da dose absorvida, ocorreu maior escurecimento do vidro. Esse fenômeno aconteceu devido aos defeitos ou imperfeições originadas pela exposição à radiação, que alteraram os centros de cor na estrutura do vidro e provocaram o surgimento de uma cor acastanhada (Nassau, 1983; Nassau, 1984).

6.3.2 Análise da alumina por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X

O MEV-EDS permite a caracterização da forma e do grau de porosidade intra e intergranular, além de identificar os elementos emissores da radiação (Brambilla, 2013). A estrutura cristalina da alumina irradiada foi avaliada por difração de raios X. As FIG. 25 e 26; 27 e 28; 29 e 30; 31 e 32; e 33 e 34 são referentes à alumina irradiada com a mesma dose absorvida, 10, 15, 25 e 50 kGy e controle, respectivamente, e mostram imagens de MEV e a análise elementar por EDS. A cada experimento de aquisição da micrografia, foi obtido o espectro de distribuição elementar.

Nas FIG. 26, 28, 30, 32 e 34, os pontos coloridos destacam os elementos O e Al que foram determinados na análise elemental.

FIGURA 25 - Al_2O_3 submetida à dose de 10 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elemental.

FIGURA 26 - Al_2O_3 submetida à dose de 10 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.

FIGURA 27 - Al_2O_3 submetida à dose de 15 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.

FIGURA 28 - Al_2O_3 submetida à dose de 15 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.

FIGURA 29 - Al_2O_3 submetida à dose de 25 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.

FIGURA 30 - Al_2O_3 submetida à dose de 25 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.

FIGURA 31 - Al_2O_3 submetida à dose de 50 kGy. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.

FIGURA 32 - Al_2O_3 submetida à dose de 50 kGy. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.

FIGURA 33 - Al_2O_3 controle, não submetida à irradiação. a) Micrografia; b) espectro dos elementos; e c) gráfico percentual de distribuição elementar.

FIGURA 34 - Al_2O_3 controle, não submetida à irradiação. a) Micrografia com destaque dos elementos por cor; e b) espectro dos elementos.

As imagens de MEV mostraram que o Al_2O_3 se apresentou mais fragmentado nas doses absorvidas maiores, especialmente em 25 e 50 kGy. Todos os espectros de análise elemental evidenciaram a predominância dos elementos alumínio e oxigênio, como esperado. Apenas um dos espectros obtido na amostra submetida à dose de 15 kGy (FIG. 27) indicou o elemento ferro como um possível contaminante que pode ter sido alguma interferência proveniente do equipamento ou do material

utilizado para a execução da análise, pois o espectro da mesma amostra da FIG. 26 não evidencia esse contaminante.

Os espectros de difração de raios X para as aluminas das colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy e controle estão dispostos na FIG. 35 mostrando as intensidades de emissão (y) de cada amostra na faixa de 10 a 70 θ , onde θ é o ângulo entre o plano dos raios X incidentes e o plano do cristal de alumina (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

FIGURA 35 - Espectros de difração de raios X para as amostras de Al_2O_3 submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy e controle.

Os espectros de análise elementar (EDS) e os difratogramas de raios X mostraram que não houve alteração significativa na estrutura cristalina da alumina submetida às diferentes doses de radiação, por se tratar da forma estável alfa (α - Al_2O_3) (Vichenewski, 2007).

6.3.3 Análise do Teflon®

A Análise Termogravimétrica (TGA) (FIG. 36) verificou a variação de massa em função da temperatura ou do tempo, e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (FIG. 37) forneceu medidas simultâneas das alterações da massa e do fluxo de calor diferencial, onde se registrou a diferença de temperatura entre a substância e um material de referência inerte em função da temperatura ou do tempo (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

A FIG. 36 mostra os espectros de TGA obtidos de tiras de Teflon® que são colocadas no interior das colunas de gerador (FIG. 3). O Teflon® foi submetido às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.

FIGURA 36 – Espectros de TGA obtidos das amostras de Teflon® submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.

Observou-se que as regiões onde não ocorrem mudanças de massa são as porções horizontais da curva (platôs) e os materiais irradiados nas doses mais altas apresentaram alterações em temperaturas e tempos inferiores ao material controle.

FIGURA 37 – Espectros de DSC obtidos das amostras de Teflon® submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.

O espectro por DSC mostrado na FIG. 37 evidenciou que quanto maior a dose absorvida, maior a alteração (quebra de cadeia polimérica e formação de ligações cruzadas) do material. Por volta de 400 °C ocorre oxidação (reação exotérmica) do polímero.

A irradiação de polímeros ocasiona processos de degradação (mudanças físicas e químicas), tanto em nível microscópico como macroscópico, dependendo da taxa de dose e da dose total aplicada.

Chipară & Chipară (1992) avaliaram o PTFE puro e com carbono que foram irradiados em temperatura ambiente e ao ar (oxigênio) com uma fonte de ^{60}Co a várias taxas de dose e realizaram testes mecânicos e por espectrometria de elétron spin. A força tensil diminuiu nas duas amostras com o aumento da dose. Zhong et al. (1993) avaliaram a estabilidade do PTFE irradiado e verificaram que aumentos na temperatura de irradiação e na cristalinidade aumentam a estabilidade à radiação enquanto que foi observado que um aumento da concentração de oxigênio no sistema acima de uma certa faixa tem pouco efeito nas reações induzidas por radiação no PTFE. Oshima et al. (1995) estudaram os efeitos da irradiação de PTFE em uma ampla faixa de temperatura de irradiação (temperatura ambiente até 380 °C) com raios gama e feixe de elétrons analisando as mudanças nas propriedades mecânicas e térmicas. Observou-se que, na dose absorvida de 5 kGy, o alongamento na quebra e a força tensil diminuiu bastante em qualquer temperatura abaixo do ponto de fusão, ocorrendo a quebra de cadeia, sendo que na temperatura de fusão de 327 °C e acima, as alterações são ainda maiores. As investigações de Lappan et al. (2001) demonstraram que a estrutura química e várias propriedades do PTFE sofrem grandes alterações pela irradiação com feixe de elétrons. As análises por DSC e difração de raios X de grande ângulo indicaram que a cristalinidade do PTFE irradiado com altas doses é reduzida. A análise termogravimétrica mostrou que a estabilidade térmica do PTFE modificado pela radiação é consideravelmente menor do que a do PTFE não irradiado (Lappan, 2001). Harling et al. (2002) irradiaram amostras de PTFE com aproximadamente 0,3 a 50×10^6 Gy para gama e cerca de 0,13 a 80×10^4 Gy para nêutrons rápidos e observaram que, com exceção da significativa fragilização do material, não houve grandes alterações nas dimensões e na forma, não ocorreu degradação e a perda de flúor foi de, no máximo, 1,5%, mesmo nas doses mais altas.

O Guia de Referência Nordion para Materiais Compatíveis com a radiação gama relaciona os níveis de tolerância da radiação gama para vários polímeros, entre eles o PTFE apresenta o valor limite de 5 kGy (NORDION, 2011).

6.3.4 Avaliação dos eluatos de geradores montados com colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy: adição de molibdato não radioativo

A FIG. 38 mostra a montagem do sistema “frio” (sem atividade radioativa) do gerador para a realização das eluições para avaliação dos diversos parâmetros.

FIGURA 38 - Dispositivo montado para a realização das eluições no sistema “frio” (sem atividade radioativa).

Os eluatos de geradores montados com colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy e controle foram avaliados quanto à esterilidade pelo método de inoculação direta em meios de cultura de TSB e tioglicolato e não apresentaram crescimento microbiano após 14 dias de incubação. Foram também realizados ensaios de determinação de endotoxinas bacterianas pelo método LAL de formação de gel com todos os resultados dentro do especificado. A quantificação de alumínio (Al) foi realizada por técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Os resultados estão relacionados na TAB. 7 e na FIG. 39.

TABELA 7 – Resultados de Al, teste de esterilidade e endotoxinas bacterianas nos eluatos de geradores montados com colunas irradiadas com 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.

Dose (kGy)	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Esterilidade	Endotoxinas**
			Bacterianas (UE mL^{-1})
10	63,20	Ausência de crescimento	<12,5
15	84,74		
25	57,44		
50	52,24		
Controle	149,70		

*Diluição 1:200; ** Diluição de 1:100.

A FIG. 39 apresenta as concentrações de Al liberadas na eluição de geradores montados com colunas submetidas à radiação gama (TAB. 7).

FIGURA 39 – Concentração de Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos eluatos de geradores montados com colunas expostas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle.

A alta concentração de alumínio, maior do que o valor limite permitido nas monografias das farmacopeias (limite de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ da farmacopeia europeia) para eluato de gerador era esperada, pois não se procedeu à lavagem da coluna com solução de cloreto de sódio 0,9% conforme procedimento estabelecido no processo de produção. Também não foi utilizado o filtro esterilizante na saída da coluna de alumina, que retém alumínio e molibdênio.

As mesmas colunas utilizadas foram secas utilizando-se frascos em vácuo. Em seguida, carregadas com 0,5 mL de solução de molibdato de sódio 20 mg mL^{-1} , pH 1,5, para se avaliar a capacidade de adsorção de molibdato ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Após 24 horas, as amostras obtidas por eluição foram analisadas quanto ao teor de Mo e Al por ICP-OES (TAB. 8).

TABELA 8 – Resultados de Al e Mo dos eluatos de geradores montados com colunas irradiadas com 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle, e adicionadas de solução de molibdato de sódio.

Dose (kGy)	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Mo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Retenção Mo (%)
10	9,45	0,178	99,99
15	11,28	0,213	99,99
25	10,19	0,218	99,99
50	6,50	0,219	99,99
Controle	14,93	0,450	99,97

*Diluição 1:20

A FIG. 40 mostra um gráfico com os valores de Al e Mo relacionados na TAB. 8.

FIGURA 40 – Resultados de Al e Mo nos eluatos provenientes de geradores montados com colunas submetidas às doses absorvidas de 10, 15, 25 e 50 kGy, e controle, e adicionadas de molibdato não radioativo.

Os resultados obtidos mostraram que as colunas que foram submetidas às doses maiores de radiação retiveram mais Al do que a coluna controle, enquanto que todas as colunas mostraram alta capacidade de adsorção do MoO_4^- .

A dose absorvida de 25 kGy foi a escolhida para os experimentos seguintes haja vista os resultados de carga microbiana relacionada à dose de verificação e esterilização, teste de esterilidade e apirogenicidade, e capacidade de adsorção do molibdato de sódio nas colunas irradiadas com essa dose.

6.4 Avaliação dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ preparados com colunas submetidas à dose absorvida de 25 kGy

A dose de verificação é a dose de radiação (kGy) necessária para atender um Nível de Garantia de Esterilidade ($s = 10^{-2}$) (ISO 11137-2, 2006). Assim, a dose de verificação definida para a coluna de alumina foi de 7,2 kGy, conforme apresentado na TAB. 5. Dez unidades de coluna foram irradiadas com dose absorvida de 10 kGy e submetidas individualmente ao teste de esterilidade em 300 mL de meio de cultura TSB e incubadas a $32,5 \pm 2,5$ °C por 14 dias. Na FIG. 41 são mostradas algumas colunas imersas em caldo de TSB dentro de sacos estéreis descartáveis para o teste de esterilidade.

FIGURA 41 - Colunas imersas em caldo de TSB dentro de sacos estéreis descartáveis para o teste de esterilidade.

Todas as colunas incubadas apresentaram ausência de crescimento microbiano, levando ao estabelecimento da dose de esterilização de 25 kGy pela Tabela 5 da norma ISO 11137-2:2006, coincidindo com a dose estabelecida pelo método VDmax da mesma norma (ISO 11137-2, 2006).

Os parâmetros estabelecidos nas monografias das farmacopeias americana e europeia para o eluato de pertecnetato de sódio, obtido por eluição do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ estão relacionados na TAB. 9.

Os geradores com atividades de 9,25 GBq (250 mCi) e 74 GBq (2.000 mCi) montados com colunas irradiadas a 25 kGy foram avaliados quanto ao pH, à pureza radioquímica, esterilidade e endotoxina bacteriana, ao rendimento de eluição, à atividade de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, e ao teor de Al nos eluatos, e apresentaram resultados que estão mostrados nas TAB. 10 e 11.

TABELA 9 – Especificações para o eluato de pertecnetato de sódio obtido por eluição do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ nas monografias das farmacopeias americana e europeia (USP 37, 2014; EP 7, 2010).

Característica	Especificação USP	Especificação EP
pH	4,5 - 7,5	4,0 – 8,0
Pureza radioquímica (%)	≥ 95	≥ 95
Pureza radionuclídica (kBq ^{99}Mo /MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$)	$< 0,15$	< 1
Pureza química ($\mu\text{g mL}^{-1}$ Al)	≤ 10	≤ 5

A medida do pH e a porcentagem de pureza radioquímica (n=3 fitas) dos eluatos foram determinadas na primeira eluição dos geradores logo após a montagem completa do sistema e os valores obtidos foram: pH = 7,0 e pureza radioquímica de $99,98 \pm 0,01\%$ e $99,94 \pm 0,06\%$ para os eluatos dos geradores de 9,25 GBq e 74 GBq, respectivamente. As amostras demonstraram estar estéreis e livres de endotoxina bacteriana.

Na TAB. 10 estão relacionados os dados de 10 eluições diárias realizadas no gerador de 9,25 GBq montado com coluna irradiada a 25 kGy, discriminando dia e hora da eluição, atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, relação $\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/\text{mCi } ^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ou kBq ^{99}Mo /MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$) e concentração de Al. Para análise de Al por ICP-OES, o limite de detecção considerado para o Al foi $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o Mo $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tavares, 2013).

TABELA 10 – Dados obtidos de 10 eluições diárias do gerador de 9,25 GBq

Dia	Hora	^{99m}Tc (mCi) medido	^{99m}Tc (mCi) teórico	Rendimento (%)	$\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/$ $\text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	9:11	305,0	250	122	0,000	0,005
2	7:00	216,0	197	110	0,016	0,022
3	8:00	173,0	154	112	0,001	0,026
4	7:00	129,5	121	107	0,001	0,028
5	6:53	101,2	95	106	0,010	0,018
6	15:27	76,3	72	106	0,006	0,032
7	7:42	51,3	51	101	0,010	0,036
8	7:18	36,5	40	92	0,012	0,035
9	7:20	28,7	32	90	0,022	0,042
10	7:50	22,1	25	88	0,030	0,045

A TAB. 11 relaciona os dados das 10 eluições diárias realizadas no gerador de 74 GBq montado com coluna irradiada com dose de 25 kGy.

TABELA 11 - Dados obtidos de 10 eluições diárias do gerador de 74 GBq.

Dia	Hora	^{99m}Tc (mCi) medido	^{99m}Tc (mCi) teórico	Rendimento (%)	$\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/$ $\text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	8:50	2170,0	2000	108	0,001	0,020
2	6:50	1548,0	1573	98	0,006	0,018
3	8:10	1239,0	1233	100	0,009	0,016
4	7:15	932,0	970	96	0,001	0,012
5	7:00	731,0	763	96	0,045	0,009
6	15:31	547,0	577	95	0,012	0,008
7	7:48	369,0	410	90	0,028	0,013
8	7:24	262,0	322	81	0,000	0,008
9	7:24	206,0	253	81	0,002	0,009
10	7:55	158,9	199	80	0,002	0,009

As TAB. 10 e 11 apresentam resultados dentro do perfil esperado para os geradores de 9,25 e 74 GBq.

Cerca de 10 semanas após a fabricação, os dois geradores foram desmontados e tiveram suas colunas de alumina retiradas para avaliação externa. Foram observadas atividades radioativas residuais e devido à presença de ^{99}Tc ($t_{1/2} = 2,11 \times 10^5$ anos) e ^{99}Mo ($t_{1/2} = 66$ horas), não foi possível retirar o conteúdo pois são tratados como rejeito radioativo.

A coluna do gerador que foi carregada com 74 GBq apresentou uma coloração acastanhada mais intensa na região superior da alumina mostrada na FIG. 42, que corresponde à área do carregamento do Mo e a etiqueta de plástico que envolvia a coluna tornou-se quebradiça, enquanto que a coluna carregada com 9,25 GBq não mostrou alteração significativa de cor e a sua etiqueta desprende-se mais facilmente. Este fato evidencia a ação da radiação sobre os materiais.

FIGURA 42 - Colunas dos geradores desmontados de 9,25 GBq à esquerda, e de 74 GBq à direita, após cerca de 10 semanas de carregamento de ^{99}Mo .

6.5 Avaliação de desempenho de colunas submetidas à dose absorvida de 25 kGy – estudo de estabilidade

As colunas esterilizadas a 25 kGy foram posicionadas em sistema do gerador (FIG. 43) e avaliadas quanto a:

Aparência – verificação visual de alteração de cor, aparecimento de trincas e/ou manchas, alteração no Teflon[®] e na placa de vidro sinterizado; verificação de sulcos ou rachaduras no corpo da alumina. Foi mantido um conjunto de colunas irradiadas a 25 kGy em um pacote fechado para ser utilizado na comparação de cor (FIG. 44).

Desempenho – verificação de alteração no tempo de eluição e no volume eluído. Os critérios de aceitação foram: tempo de 30 a 50 segundos e volume de $6,0 \pm 0,5$ mL.

Como critério de conformidade considerou-se conforme em caso de até dois resultados de rejeição em 10 amostras analisadas. O modelo de formulário para preenchimento dos resultados, bem como os ensaios realizados com os critérios de aceitação encontram-se no Apêndice A.

FIGURA 43 - Sistema para avaliação de desempenho das colunas irradiadas a 25 kGy.

FIGURA 44 - Colunas controle para comparação visual de cor.

Na FIG. 45 estão mostrados os gráficos dos resultados de tempo médio de eluição e volume médio eluído em três lotes diferentes de coluna irradiadas a 25 kGy

durante seis meses. Os registros foram feitos em modelo de formulário mostrado no Apêndice B.

FIGURA 45 – Variação dos tempos médios (a) e volumes médios (b) de eluição, em colunas esterilizadas a 25 kGy, durante seis meses.

O tempo de eluição variou entre 37 e 48 segundos com volume de eluição de 5,5 a 6,5 mL, dentro dos valores especificados.

6.6 Cálculos dosimétricos para condição de maior exposição à radiação e para diferentes posições de um microrganismo

Foi feita uma estimativa teórica da dose absorvida pela alumina durante o tempo de total de 10 dias, considerando 3 de calibração e 7 de utilização e que não houve eluição do gerador. Desta forma, manteve-se de maneira constante a atividade radioativa do tecnécio em equilíbrio com a do molibdênio. A atividade inicial considerada foi de 157,73 GBq (4263,1 mCi) para obtenção da atividade nominal de 74 GBq após 3 dias.

No cálculo da dose absorvida na alumina foram utilizados modelos matemáticos levando-se em consideração a geometria da coluna de vidro e o cilindro formado pelo volume onde se concentra o material radioativo – fonte (FIG. 46) para estabelecer uma condição de maior exposição à radiação gama proveniente do tecnécio e radiação beta do molibdênio – alvo (Shani, 2001).

Sequência dos cálculos realizados:

Geometria da coluna (Alumina – Al_2O_3)

- ❖ Determinação do volume de alumina contendo $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

Através das medidas da coluna do gerador de tecnécio (FIG. 46) e da delimitação da provável região de distribuição do ^{99}Mo na coluna de vidro (FIG. 47) foram definidas as condições geométricas para cálculo da dose absorvida na alumina para uma condição de maior exposição (alvo). A coloração mais escura na coluna de vidro indicou a região em que o material radioativo (fonte) ficou mais concentrado (FIG. 47).

Legenda: 1 – Coluna de vidro Pyrex com 69 mm de altura; 2 – Placa porosa G2; 3 – Tampa inferior; 4 – Tampa superior; 5 – Teflon; 6 – Alumina; 6a – Volume de alumina contendo ^{99}Mo .

FIGURA 46 – Esquema da coluna do gerador. a) sem ^{99}Mo e b) alumina com região de concentração de ^{99}Mo destacada em vermelho.

FIGURA 47 – Coluna de vidro que foi exposta à radiação do ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ à esquerda, e coluna não exposta, à direita.

Para determinação do volume de alumina contendo o ^{99}Mo distribuído uniformemente foi considerado um diâmetro de 14 mm e comprimento de 10 mm, totalizando um volume de $1538,6 \text{ mm}^3$ (item 6_a da FIG. 46).

❖ Determinação do volume de alumina em **voxel** (matemático)

A determinação matemática do cilindro que representa a condição geométrica da alumina foi realizada através da equação do cilindro em coordenadas cartesianas (FIG. 48). Com a geometria cilíndrica determinada em pontos cartesianos pode-se trabalhar com vetores para determinação das distâncias entre pontos específicos. Neste sistema de coordenadas cartesianas, um cilindro pode ser descrito pela equação (2).

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = r^2 \quad (2)$$

Na qual,

x - coordenada x da função, $f(x,y,z) = 0$;

y - coordenada y da função, $f(x,y,z) = 0$;

a e b - coordenadas do centro da circunferência. Para o cilindro, os valores de **a** e **b** deverão ser iguais; e

r - raio da circunferência

FIGURA 48 - Construção de um cilindro utilizando coordenadas cartesianas.

❖ Determinação das características do alvo

O alvo foi centralizado para considerar a situação de maior deposição de energia no meio material (FIG. 49), caracterizado pela posição central nas coordenadas $f(0;5;0)$ e volume de $0,01 \text{ mm}^3$.

Dimensões: $r = 7,0 \text{ mm}$ e $h = 10 \text{ mm}$.

FIGURA 49 - Reconstrução do cilindro de alumina identificando o ponto alvo para cálculo dosimétrico.

Dosimetria

Para o cálculo dosimétrico foram consideradas as emissões gama e beta do ^{99}Mo e gama do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, durante um período de 7 dias sem a realização de eluições do gerador. A maior atividade comercializada do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é de 74 GBq, o qual foi carregado com uma atividade inicial de 157,73 GBq (4263,1 mCi), considerando calibração de 3 dias.

➤ Determinação da constante gama

O valor tabelado da constante gama foi definido em termos de deposição da energia no ar. Entretanto, foi necessário corrigir este valor para deposição da energia no material analisado. O valor da constante gama no ar para as fontes de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ são $26,77 \mu\text{Gy} \cdot \text{GBq}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ e $29,10 \mu\text{Gy} \cdot \text{GBq}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, respectivamente. O fator de correção para deposição de energia entre a alumina e o ar é de 1,0657 (Unger & Trubey, 1982).

➤ Determinação da atividade integrada

A atividade integrada no período de 10 dias foi de 373.015,4 mCi.h. Considerando a quantidade total de 1536900 *voxels* para este sistema, a atividade integrada no período por unidade de voxel foi de 0,24271 mCi.h para uma distribuição homogênea (Shani, 2001; Table of Radioactive Radioisotopes, 2012).

➤ Determinação da dose absorvida devido à emissão gama e beta

O cálculo dosimétrico considerou a somatória das emissões gama e beta de cada fonte pontual (*voxel*) determinando as distâncias e as respectivas atenuações causadas pela própria alumina. Para este cálculo foram utilizadas as emissões gama do ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Shani, 2001; Table of Radioactive Radioisotopes, 2012).

➤ Determinação da dose total absorvida

A dose total absorvida pelo alvo é a somatória das doses absorvidas pelas fontes pontuais emisoras beta e gama dos radionuclídeos ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Shani, 2001; Table of Radioactive Radioisotopes, 2012).

A Equação (3) foi utilizada para o cálculo da dose total absorvida (Shani, 2001):

$$D = D_{\gamma}(A \leftarrow F) + D_{\beta}(A \leftarrow F) \quad (3)$$

Na qual:

- D - dose total absorvida pelo alvo (Gy);
- D_{γ} - dose absorvida - emissão gama (Gy);
- D_{β} - dose absorvida - emissão beta (Gy);
- A - Alvo; e
- F - Fonte.

A dose total absorvida calculada para o ponto de maior exposição da alumina (alvo) no gerador de 74 GBq foi de **631,1 kGy**, conforme apresentado na TAB. 12.

Observou-se que a dose obtida nesse ponto foi muito maior do que as doses que foram utilizadas nos estudos de determinação da dose de esterilização (TAB. 5), constituindo-se assim a situação de pior caso.

TABELA 12 - Identificação das variáveis utilizadas no cálculo dosimétrico e dose total absorvida para gerador de 74 GBq.

Coluna do gerador (Al_2O_3):		Características físicas:	
- Raio	7,0 mm	- Meia-vida física (^{99}Mo)	65,94 horas
- Comprimento	10,0 mm	- Meia-vida física ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)	6,01 horas
- Volume	1538,6 mm ³	- Γ (^{99}Mo no Ar)	26,77 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
Solução de ^{99}Mo :		- Γ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ no Ar)	29,10 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-2}$
- Volume	1 mL	- Coef. Aten. Mássico (Ar)	0,02496 cm ² ·g ⁻¹
- Atividade calibração	74 GBq	- Coef. Aten. Mássico (Al_2O_3)	0,02660 cm ² ·g ⁻¹
- Nº dias da calibração	3 dias	- Γ (^{99}Mo no Al_2O_3)	28,53 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
- Prazo de validade	7 dias	- Γ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ no Al_2O_3)	31,01 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-2}$
- Atividade inicial	157,7 GBq	- Densidade do Al_2O_3	3,94 g·cm ⁻³
Cilindro matemático:		- Atividade integrada	373015,4 mCi.h
- Nº de Pontos ou Voxel	1536900	- Energia beta máxima	1,215 MeV
- Atividade por voxel	2,774 μCi	- Energia beta média	1,082 MeV
- Volume do alvo central	0,01 mm ³	Dosimetria:	
- Raio do alvo central	0,13 mm	- Dose total	631,1 kGy

O mesmo cálculo foi realizado, considerando-se o gerador de menor atividade (9,25 GBq) também produzido no IPEN-CNEN/SP, e os resultados estão apresentados na TAB. 13.

TABELA 13 - Identificação das variáveis utilizadas no cálculo dosimétrico e dose total absorvida para gerador de 9,25 GBq.

Coluna do gerador (Al_2O_3):		Características físicas:	
- Raio	7,0 mm	- Meia-vida física (^{99}Mo)	65,94 horas
- Comprimento	10,0 mm	- Meia-vida física ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)	6,01 horas
- Volume	1538,6 mm ³	- Γ (^{99}Mo no Ar)	26,77 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
Solução de ^{99}Mo :		- Γ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ no Ar)	29,10 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-2}$
- Volume	1 mL	- Coef. Aten. Mássico (Ar)	0,02496 cm ² ·g ⁻¹
- Atividade calibração	9,25 GBq	- Coef. Aten. Mássico (Al_2O_3)	0,02660 cm ² ·g ⁻¹
- Nº dias da calibração	3 dias	- Γ (^{99}Mo no Al_2O_3)	28,53 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
- Prazo de validade	7 dias	- Γ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ no Al_2O_3)	31,01 $\mu\text{Gy}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{GBq}^{-1}\cdot\text{h}^{-2}$
- Atividade inicial	19,72 GBq	- Densidade do Al_2O_3	3,94 g·cm ⁻³
Cilindro matemático:		- Atividade integrada	46626,9 mCi.h
- Nº de Pontos ou Voxel	1536900	- Energia beta máxima	1,215 MeV
- Atividade por voxel	0,347 μCi	- Energia beta média	1,082 MeV
- Volume do alvo central	0,01 mm ³	Dosimetria:	
- Raio do alvo central	0,13 mm	- Dose total	78,9 kGy

Utilizando-se a mesma planilha que a utilizada para o cálculo de dose no ponto de máxima exposição, é possível se estimar doses em diferentes pontos do material com vistas à dosimetria em possíveis microrganismos contaminantes. Foram consideradas mais duas posições distintas: na região mais externa da coluna de vidro e na região central inferior da alumina sobre a placa porosa. Foram feitas simulações de duas eluições diárias a cada 4 horas (FIG. 50).

FIGURA 50 - Curva de eluição do gerador de 74 GBq a cada 4 horas.

O cálculo dosimétrico foi feito para alguns pontos da coluna, incluindo a dose aplicada a um microrganismo localizado na lateral (FIG. 51) e na parte inferior da coluna de vidro (FIG. 52), levando-se em conta as variáveis das TAB. 12 e 13 e as distâncias entre a fonte radioativa (^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$) e cada alvo considerado (posição lateral ou inferior da coluna).

DOSE GAMA		-10,0	-9,0	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	-3,0	-2,0	-1,0	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
-10,0																						
-9,0																						
-8,0																						
-7,0												14,65										
-6,0											13,78	18,06	23,44									
-5,0										12,23	16,37	21,81	28,87	37,84								
-4,0									10,3	13,99	18,99	25,72	34,71	46,55	61,76							
-3,0							8,292	11,37	15,6	21,43	29,45	40,46	55,48	75,67	102,1							
-2,0						6,433	8,86	12,23	16,91	23,44	32,59	45,44	63,5	88,79	123,7	170,4						
-1,0					4,84	6,675	9,224	12,78	17,76	24,77	34,71	48,87	69,18	98,46	140,7	201	283,4					
0,0				3,553	4,896	6,759	9,35	12,97	18,06	25,24	35,46	50,1	71,25	102,1	147,2	213,5	308,9	432,9				
1,0					4,84	6,675	9,224	12,78	17,76	24,77	34,71	48,87	69,18	98,46	140,7	201	283,4					
2,0						6,433	8,86	12,23	16,91	23,44	32,59	45,44	63,5	88,79	123,7	170,4						
3,0							8,292	11,37	15,6	21,43	29,45	40,46	55,48	75,67	102,1							
4,0								10,3	13,99	18,99	25,72	34,71	46,55	61,76								
5,0									12,23	16,37	21,81	28,87	37,84									
6,0										13,78	18,06	23,44										
7,0											14,65											
8,0																						
9,0																						
10,0																						

FIGURA 51 - Dosimetria gama em um microrganismo na lateral da coluna de vidro de um gerador de 74 GBq.

DOSE GAMA		-10,0	-9,0	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	-3,0	-2,0	-1,0	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
-10,0																						
-9,0																						
-8,0																						
-7,0												0,152										
-6,0											0,164	0,165	0,164									
-5,0										0,172	0,176	0,177	0,176	0,172								
-4,0									0,177	0,182	0,186	0,187	0,186	0,182	0,177							
-3,0								0,177	0,185	0,191	0,195	0,196	0,195	0,191	0,185	0,177						
-2,0							0,172	0,182	0,191	0,197	0,201	0,202	0,201	0,197	0,191	0,182	0,172					
-1,0						0,164	0,176	0,186	0,195	0,201	0,205	0,206	0,205	0,201	0,195	0,186	0,176	0,164				
0,0		0,152	0,165	0,177	0,187	0,196	0,202	0,206	0,208	0,206	0,202	0,202	0,196	0,187	0,177	0,165	0,152					
1,0			0,164	0,176	0,186	0,195	0,201	0,205	0,206	0,205	0,201	0,195	0,186	0,176	0,164							
2,0					0,172	0,182	0,191	0,197	0,201	0,202	0,201	0,197	0,191	0,182	0,172							
3,0						0,177	0,185	0,191	0,195	0,196	0,195	0,191	0,185	0,177								
4,0							0,177	0,182	0,186	0,187	0,186	0,182	0,177									
5,0								0,172	0,176	0,177	0,176	0,172										
6,0									0,164	0,165	0,164											
7,0											0,152											
8,0																						
9,0																						
10,0																						

FIGURA 52 - Dosimetria gama em um microrganismo na parte inferior da coluna de alumina de um gerador de 74 GBq.

As FIG. 53 e 54 ilustram, respectivamente, as posições de um microrganismo na coluna de alumina e nos filtros.

FIGURA 53 – Ilustração da posição de um microrganismo na lateral (a) e parte inferior (b) da coluna de vidro para o cálculo dosimétrico.

FIGURA 54 - Ilustração da posição de um microorganismo no filtro Sep-Pak® e no filtro Millex® 0,22 µm para o cálculo dosimétrico.

A TAB. 14 apresenta os resultados da dosimetria de um microorganismo localizado na lateral e na base da coluna, nos filtros Sep-Pak® e Millex® 0,22 µm para gerador de 9,25 GBq e 74 GBq.

TABELA 14 - Resultados da dosimetria para microorganismo nas posições lateral da coluna, na base da coluna de alumina e nos filtros Sep-Pak® e Millex® 0,22 µm em gerador de 9,25 GBq e 74 GBq.

Gerador p/ 3 dias (GBq)	Posição da bactéria			
	Lateral (Gy)	Inferior (Gy)	Sep-Pak® (Gy)	Millex® (Gy)
9,25	2967,5	124,5	1,07	1,07
74	23740,7	996,1	8,59	8,59

Gerador p/ 14 dias (GBq)	Posição da bactéria			
	Lateral (Gy)	Inferior (Gy)	Sep-Pak® (Gy)	Millex® (Gy)
9,25	3728,3	193,3	226,2	75,2
74	29828,2	1546,1	1809,7	601,9

A dose calculada para um microrganismo na região lateral da coluna próxima à área de concentração de ^{99}Mo é significativamente maior do que na parte inferior da coluna com valores máximos de 3728,3 e 29828,2 Gy para geradores de 9,25 e 74 GBq, respectivamente.

Quanto maior a distância da fonte radioativa, menor é a dose absorvida e, portanto, a exposição do microrganismo à radiação é menor, aumentando as chances de sobrevivência.

6.7 Avaliação da eficácia da radiação gama na morte de microrganismos

6.7.1 Quantificação do *B. subtilis* – levantamento da curva padrão por espectrofotometria UV-Vis

As FIG. 55 e 56 exibem as várias etapas de processamento do microrganismo *B. subtilis*.

FIGURA 55 – *B. subtilis*. (a) Cultura mãe em ágar inclinado; (b) Cultura de 24 horas.

FIGURA 56 – *Pour-plate* da série de diluições de *B. subtilis*.

A TAB. 15 mostra os resultados das contagens das diluições seriadas em *pour-plate*, com a concentração determinada de *B. subtilis* de $9,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

A TAB. 16 relaciona as absorbâncias em 580 nm de diluições seriadas decrescentes da suspensão de *B. subtilis* não diluída para construção da curva padrão.

TABELA 15 – Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. subtilis* não diluído.

Diluição	Contagem bruta (UFC)	Contagem média (UFC)	Concentração Bacteriana (UFC mL ⁻¹)
10 ⁻⁴	2636	NA	NA
	2216		
10 ⁻⁵	96	98	98 x 10 ⁵
	100		
10 ⁻⁶	23	NA	NA
	14		
Concentração média:			9,8 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹

NA – Não aplicável (fora do intervalo de contagem 30-300 UFC)

TABELA 16 - Absorbância em 580 nm de concentrações decrescentes de *B.subtilis*.

Diluição	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹)	Absorbância (A)
Não diluído	9,8 x 10⁶	0,133
1:2	4,9 x 10 ⁶	0,083
1:4	2,4 x 10 ⁶	0,058
1:8	1,2 x 10 ⁶	0,046
1:16	6,1 x 10 ⁵	0,041
1:32	3,1 x 10 ⁵	0,038
1:64	1,5 x 10 ⁵	0,037
1:128	7,7 x 10 ⁴	0,036

A FIG. 57 mostra a curva padrão de *B.subtilis* construída a partir dos dados da TAB. 16.

FIGURA 57 - Curva padrão de *B.subtilis*.

A Equação 4 para se determinar a concentração de *B.subtilis* no intervalo de 7,7 x 10⁴ a 9,8 x 10⁶ UFC mL⁻¹ é:

$$A = 1,0 \times 10^{-8} [B. subtilis] + 0,0348 \quad (4)$$

Segundo Pinto et al. (2010), estudos de densidade óptica de diferentes culturas, em diferentes momentos, indicaram que o método fotométrico permite uma medida acurada do número de células quando há uniformidade no tamanho das mesmas, embora geralmente o que se está medindo é a massa e não número de células (Pinto et al., 2010).

Carregamento da coluna de gerador com *B. subtilis* para estudo de recuperação microbiana

A TAB. 17 apresenta as contagens em UFC das duplicatas das diluições de 10^{-2} a 10^{-6} de uma suspensão de *B. subtilis* que foi preparada, quantificada e inoculada na coluna do gerador.

TABELA 17 – Contagens em UFC das diluições de 10^{-2} a 10^{-6} de *B. subtilis*.

Diluição Nº UFC	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Placa 1	zero	4	43	>300	>300
Placa 2	1	1	48	>300	>300
Concentração média = $4,5 \times 10^5$ UFC mL ⁻¹					

Os valores de contagem que foram considerados são referentes à diluição 10^{-4} ; e, portanto, o valor da concentração de *B. subtilis* foi de $4,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

A técnica de determinação do Número Mais Provável (NMP) de microrganismos baseia-se em estimativa fundamentada em probabilidade, e por isso são utilizadas tabelas estatísticas específicas para obtenção dos resultados a partir das leituras. A TAB. 18 apresenta situações obtidas com 3 réplicas, fornecendo para cada combinação de número de tubos com crescimento, o número mais provável de microrganismos por g ou mL, assim como limites inferior e superior (limite de confiança de 95%) (FB 5, 2010; USP 37, 2014).

Nos estudos iniciais, para avaliar a recuperação microbiana nos eluatos, por se esperar valores baixos de contagem, foi utilizada esta técnica para estimar a contagem de microrganismos (Pinto et al., 2010) 18 e 24 horas após inoculação com

$4,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de *B. subtilis*. A técnica do NMP foi escolhida porque permite melhor revitalização dos microrganismos debilitados, em função do perfeito contato da amostra com o meio de cultura (Pinto et al., 2010). No experimento com o eluato de gerador, foram contados o número de tubos positivos (com turvação) e o número de tubos negativos e os resultados de contagem microbiana para os tubos com amostras dos eluatos obtidos 18 horas e 24 horas após inoculação de *B. subtilis*, estão relacionados na TAB.19.

TABELA 18 – Parte da Tabela do Número Mais Provável (NMP) para réplicas de 3 tubos e limites de confiança de 95% (FB 5, 2010; USP 37, 2014).

Número de tubos positivos			NMP por g, ou mL do produto	Limite de confiança a 95%
Número de g, ou mL do produto por tubo				
10 ⁻¹ (0,1)	10 ⁻² (0,01)	10 ⁻³ (0,001)		
2	1	2	27	09 – 94
2	2	0	21	05 – 40
2	2	1	28	09 – 94
2	2	2	35	09 – 94
2	3	0	29	09 – 94
2	3	1	36	09 – 94
3	0	0	23	05 – 94
3	0	1	38	09 – 104
3	0	2	64	16 – 181
3	1	0	43	09 – 181
3	1	1	75	17 – 199
3	1	2	120	30 – 360
3	1	3	160	30 – 380
3	2	0	93	18 – 360
3	2	1	150	30 – 380
3	2	2	210	30 – 400
3	2	3	290	90 – 990
3	3	0	240	40 – 990
3	3	1	460	90 – 1980
3	3	2	1100	200 - 4000
3	3	3	>1100	

TABELA 19 – Resultados de contagem microbiana pela técnica do NMP para eluatos obtidos 18 horas e 24 horas após inoculação de *B. subtilis*.

Eluição após 18 horas				
Tubos	Diluição			NMP (UFC mL ⁻¹)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
1	Crescimento	Crescimento	Sem crescimento	21
2	Crescimento	Crescimento	Sem crescimento	
3	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	
Eluição após 24 horas				
Tubos	Diluição			NMP (UFC mL ⁻¹)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
1	Crescimento	Crescimento	Crescimento	460
2	Crescimento	Crescimento	Sem crescimento	
3	Crescimento	Crescimento	Sem crescimento	

Tabela NMP, limite de confiança a 95% – FB 5, 2010, p. 242.

A eluição após 18 horas com resultado de contagem de 21 UFC mL⁻¹ extraiu menos microrganismos em relação à eluição de 24 horas (460 UFC mL⁻¹) demonstrando que, em tempo mais tardio a recuperação microbiana é maior provavelmente devido ao deslocamento lento dos microrganismos ao longo do leito da coluna de alumina provocado pelas eluições.

6.7.2 Quantificação dos esporos de *B. pumilus* e curva padrão por espectrofotometria UV-Vis

A FIG. 58 mostra (a) tubo de ágar inclinado com a cultura mãe e (b) cultura de 24 horas de *B. pumilus*.

FIGURA 58 – *B. pumilus*: (a) Cultura mãe; (b) Cultura de 24 horas.

Na FIG. 59 podem ser observadas as imagens dos esporos de *B. pumilus* pela coloração de Gram (a) e de Wirtz-Conklin (b). Em cinco campos visuais, observou-se uma alta porcentagem (cerca de 90%) de esporulação do *B. pumilus*.

FIGURA 59 – (a) Coloração de Gram e (b) Coloração de Wirtz-Conklin dos esporos de *B. pumilus* (aumento de 1.000x).

Na FIG. 60 podem-se visualizar as placas em duplicata das diluições seriadas de *B. pumilus* por *pour-plate*.

FIGURA 60 – *Pour-plate* da série de diluições de *B. pumilus*.

A TAB. 20 apresenta os resultados das contagens das diluições seriadas em *pour-plate* de *B. pumilus* para cálculo da concentração inicial.

TABELA 20 - Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* não diluído.

Diluição	Contagem bruta (UFC)	Contagem média (UFC)	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹)
10 ⁻⁶	> 300 > 300	NA	NA
10 ⁻⁷	> 300 > 300	NA	NA
10 ⁻⁸	51 58	53	53 x 10 ⁸
10 ⁻⁹	4 15	NA	NA
10 ⁻¹⁰	Sem crescimento Sem crescimento	NA	NA
Concentração média:			5,3 x 10 ⁹ UFC mL ⁻¹

NA – Não aplicável (fora do intervalo de contagem 30-300 UFC)

A concentração determinada de *B. pumilus* foi de 5,3 x 10⁹ UFC mL⁻¹.

A TAB. 21 relaciona as absorbâncias em 580 nm de diluições seriadas decrescentes da suspensão não diluída para obtenção da curva padrão de *B. pumilus*.

TABELA 21 - Absorbância em 580 nm de concentrações decrescentes de *B. pumilus*.

Diluição	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹)	Absorbância (A)
Não diluído	$5,3 \times 10^9$	1,634
1:2	$2,7 \times 10^9$	1,693
1:4	$1,3 \times 10^9$	1,648
1:8	$6,6 \times 10^8$	1,260
1:16	$3,3 \times 10^8$	0,741
1:32	$1,6 \times 10^8$	0,457
1:64	$8,1 \times 10^7$	0,227
1:128	$4,1 \times 10^7$	0,105

A equação da reta da curva padrão para *B. pumilus* (FIG. 61) foi obtida na faixa linear de absorbância de 0,105 – 0,457.

FIGURA 61 - Curva padrão de *B. pumilus*.

A Equação 5 da reta para se determinar a concentração de *B. pumilus* no intervalo de $4,1 \times 10^7$ a $1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ é:

$$A = 3,0 \times 10^{-9} [B.pumilus] - 0,0144 \quad (5)$$

Após 3 meses de congelamento a -20 °C, realizou-se um estudo de estabilidade para verificar a viabilidade da suspensão de esporos de *B. pumilus*. Os resultados estão relacionados na TAB. 22.

TABELA 22 - Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* após 3 meses de congelamento – estudo de estabilidade.

Diluição	Contagem bruta (UFC)	Contagem média (UFC)	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹)
10 ⁻⁶	> 300 > 300	NA	NA
10 ⁻⁷	237 245	241	2,4 x 10 ⁹
10 ⁻⁸	22 20	NA	NA
10 ⁻⁹	1 3	NA	NA
10 ⁻¹⁰	Sem crescimento Sem crescimento	NA	NA
Concentração média:			2,4 x 10 ⁹ UFC mL ⁻¹

NA – Não aplicável (fora do intervalo de contagem 30-300 UFC).

Observou-se uma perda de cerca de 50% na viabilidade celular, mas foi mantida a ordem de grandeza de 10⁹.

Uma nova preparação de suspensão quantificada de esporos de *B. pumilus* foi preparada, e os resultados estão apresentados nas TAB. 23 e 24.

TABELA 23 - Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* - repetição.

Diluição	Contagem bruta (UFC)	Contagem média (UFC)	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹)
10 ⁻⁶	> 300 > 300	NA	NA
10 ⁻⁷	125 123	124	NA
10 ⁻⁸	15 14	NA	NA
10 ⁻⁹	1 2	NA	NA
10 ⁻¹⁰	Sem crescimento Sem crescimento	NA	NA
Concentração média: 1,24 x 10 ⁹ UFC mL ⁻¹			

NA – Não aplicável (fora do intervalo de contagem 30-300 UFC).

TABELA 24 - Absorbância em 580 nm de concentrações decrescentes de *B. pumilus* – repetição.

Diluição	Concentração bacteriana (UFC mL ⁻¹)	Absorbância (A)
Não diluído	1,2 x 10 ⁹	1,678
1:2	6,0 x 10 ⁸	1,654
1:4	3,0 x 10 ⁸	1,270
1:8	1,5 x 10⁸	0,722
1:16	7,5 x 10⁷	0,377
1:32	3,8 x 10⁷	0,206
1:64	1,9 x 10⁷	0,115
1:128	1,0 x 10⁷	0,078

Foi construído um gráfico (FIG. 62) com os dados descritos na TAB. 24, na faixa de absorbância de 0,078 – 0,722.

FIGURA 62 - Curva padrão de *B. pumilus* – repetição.

Para o intervalo de $1,0 \times 10^7$ a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, foi obtida a Equação 6 para relacionar a absorbância com a concentração de *B. pumilus*.

$$A = 5,0 \times 10^{-9} [B. pumilus] + 0,0301 \quad (6)$$

Comparando as Equações 5 e 6 para *B. pumilus*, observou-se que a Equação 6 foi obtida para uma faixa linear mais estendida e por isso foi utilizada para calcular a concentração do microrganismo nos experimentos seguintes.

Comparação das curvas padrão de *B. subtilis* e *B. pumilus*

A FIG. 63 mostra o gráfico com as duas curvas padrão de *B. subtilis* e *B. pumilus*.

FIGURA 63 – Curvas padrão para determinação da concentração de *B. subtilis* e *B. pumilus*.

Os esporos de *B. pumilus* possuem uma curva padrão que é linear em uma concentração maior do que a do *B. subtilis*, mas em uma faixa mais reduzida. A curva padrão do *B. subtilis* mostrou um perfil muito diferente da curva do *B. pumilus*, com contagem de bactérias na ordem de 10^6 e um intervalo linear mais longo, no qual todos os pontos foram considerados para a construção da reta, enquanto que o intervalo linear para os esporos de *B. pumilus* foi mais restrito. As características distintas (aspecto morfológico) das colônias das duas espécies podem ter contribuído para as diferenças na precisão das contagens. Enquanto que o *B. subtilis* apresenta colônias bem definidas, as colônias de *B. pumilus* possuem diferentes tamanhos, algumas com contornos não muito bem definidos e com superfície mais extensa que pode encobrir outras colônias tornando mais difícil a quantificação.

6.7.3 Coluna com molibdênio “frio” e *B. subtilis*

A partir de uma suspensão de *B. subtilis* foi feita uma diluição de 1:2 e leitura de absorvância em 580 nm para calcular a concentração pela Equação 4 da reta. Interpolando o valor de $A = 0,082$, a concentração de *B. subtilis* foi de $4,7 \times 10^6$ UFC

mL⁻¹. Os resultados de recuperação de 10 eluições sucessivas de uma coluna do gerador (eluição exaustiva) carregada com 500 µL de uma solução de molibdato de sódio (“frio”), pH 1,5 e 500 µL da suspensão diluída ($2,4 \times 10^6$ UFC) são apresentados na TAB. 25.

TABELA 25 – Contagem em UFC das diluições de 10^{-2} a 10^{-5} da mistura dos 10 eluatos.

Diluição Placa	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	2 UFC	ausência de crescimento	1 UFC	ausência de crescimento
2	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento	ausência de crescimento

Considerando que a contagem microbiana resultante do plaqueamento das diluições de 10^{-2} e 10^{-4} está fora da faixa de 30-300 UFC, a porcentagem de recuperação não foi calculada.

6.7.4 Coluna com molibdênio “frio” e esporos de *B. pumilus*

Considerando os resultados do experimento anterior, optou-se por inocular na coluna uma quantidade de *B. pumilus* ($6,0 \times 10^8$ UFC - TAB. 23) maior do que a utilizada de *B. subtilis* ($2,4 \times 10^6$ UFC), além de verificar a recuperação em eluatos de 6 mL antes de realizar a eluição exaustiva.

Nenhuma das placas inoculadas com o eluato do primeiro dia e do segundo dia após carregamento com molibdênio e suspensão de *B. pumilus* apresentou crescimento microbiano, após incubação a 32 °C por três dias. O eluato também foi submetido ao ensaio de endotoxina bacteriana e teste de esterilidade com resultados negativos. Como o teste de LAL é específico para bactérias Gram negativas, era previsível o resultado obtido, tendo em vista a espécie estudada ser Gram positiva.

Os resultados de contagem das diluições seriadas em *pour-plate* do eluato resultante de 10 eluições sucessivas, ou eluição exaustiva, estão relacionados na TAB. 26.

TABELA 26 - Contagem microbiana por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* após eluição exaustiva do gerador.

Diluição	Contagem bruta (UFC)	Contagem média (UFC)	Concentração bacteriana (UFC)
10 ⁻²	> 300 > 300	NA	NA
10 ⁻³	73 80	77	7,7 x 10 ⁴
10 ⁻⁴	4	NA	NA
Concentração média:			7,7 x 10 ⁴ UFC mL ⁻¹

NA – Não aplicável (fora do intervalo de contagem 30-300 UFC).

No eluato de 60 mL a quantidade recuperada foi de $4,6 \times 10^6$ UFC, que corresponde a 0,77 % de recuperação, sugerindo retenção de *B. pumilus* na coluna de alumina.

6.7.5 Gerador com atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc e *B. subtilis*

A partir de uma suspensão de *B. subtilis* foi feita uma diluição de 1:8 e leitura de absorbância em 580 nm para determinar a concentração pela Equação 4 da reta. Interpolando o valor de $A = 0,107$, a concentração calculada de *B. subtilis* foi de $7,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

A TAB. 27 descreve os resultados das 5 eluições realizadas no gerador de 9,25 GBq inoculado com *B. subtilis*.

TABELA 27 - Dados de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq (atividade nominal prevista de 250 mCi) inoculado com *B. subtilis*.

Eluição (dia)	Hora	^{99m} Tc (mCi) medido	^{99m} Tc (mCi) teórico	μCi ⁹⁹ Mo/ mCi ^{99m} Tc
1	10:41	618	618	0,001
2	7:50	438	485	0,008
3	9:20	220	223	0,008
4	10:05	159	173	0,004
5	11:30	118,5	125	0,002

A atividade inicial medida apresentou-se acima da atividade nominal prevista provavelmente por ter sido preparado em condições alheias àquela utilizada na produção rotineira.

A TAB. 28 relaciona os valores de Al e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador com atividade de 9,25 GBq.

TABELA 28 – Teor de alumínio e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador de 9,25 GBq inoculados com *B. subtilis*.

Eluição (dia)	Gerador controle		Gerador de 9,25 GBq	
	Al (μg mL ⁻¹)	pH	Al (μg mL ⁻¹)	pH
1	28,53	4,0	30,75	4,0
2	1,91	5,0	2,75	5,0
3	0,99	6,0	3,17	5,0
4	0,77	6,0	1,71	6,0
5	0,57	6,0	1,46	6,0

pH especificado: 4,5 – 7,5 (USP 37, 2014); 4,0 – 8,0 (EP 7, 2010).

Os valores altos de teor de alumínio e valores baixos de pH na primeira eluição provavelmente ocorreram por causa da supressão da lavagem das colunas com solução de cloreto de sódio 0,9%, procedimento que é adotado em rotina de produção para eliminar o excesso de ^{99}Mo e alumínio, e também pela utilização de tampas para gerador sem filtro Millex[®] 0,22 μm e sem Sep-Pak[®].

Na TAB. 29 é apresentada a recuperação de *B. subtilis* do gerador controle e do gerador inoculado com *B. subtilis* e ^{99}Mo com atividade nominal de 9,25 GBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

TABELA 29 – Contagem em UFC por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. subtilis* dos eluatos do gerador controle e de 9,25 GBq.

Eluição (dia)	Gerador Controle										Gerador de 9,25 GBq									
	Diluição										Diluição									
	Não dil.		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		Não dil.		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}	
1	14	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5	70	60	8	7	3	1	1	0	0	0	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Exaustiva	49	18	56	1	2	0	0	0	1	0	20	2	0	0	50	10	69	51	20	0
Total UFC	1,9 x 10 ⁴ (0,53% de Recuperação)										1,9 x 10 ⁶ (53% de Recuperação)									

A quantidade de *B. subtilis* inoculada nas colunas foi 3,6 x 10⁶ UFC; Não diluído: eluato sem diluição; as contagens abaixo de 30 UFC não foram consideradas; todas as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

O cálculo da porcentagem de recuperação foi realizado considerando-se a contagem média (dentro da faixa de trabalho de 30-300 UFC) da duplicata, a respectiva diluição, o valor médio das contagens e o volume de eluição (6 mL ou 60 mL). O total de UFC (cinco dias + eluição exaustiva) multiplicado por 100 e dividido pela quantidade de UFC do inóculo inicial resultou na porcentagem de recuperação.

Segundo Norrell & Messley (1997), a razão para a faixa de contagem entre 30 e 300 UFC ser considerada é que amostras mais representativas são obtidas quando o número de colônias cai dentro dessa faixa; menos do que 30 colônias não é

considerada uma amostra representativa (muito poucos microrganismos); mais do que 300 colônias é semelhantemente considerada não representativa porque a quantidade excessiva (*overcrowding*) de colônias resultará em um pobre crescimento de bactérias, e algumas colônias podem não ter crescido até um tamanho visível. Além disso, o erro técnico aumenta à medida que as colônias tornam-se menores, mais numerosas e mais difíceis de serem visualizadas (Norrell & Messley, 1997).

Decorridos cerca de 20 dias, a coluna do gerador controle foi desmontada sob fluxo laminar e mergulhada em 200 mL solução tampão fosfato pH 7,2. Após agitação, foram pipetados 20 mL e procedeu-se à filtração em membrana, que foi incubada em placa de TSA por 7 dias a 32 °C, para verificar se havia algum microrganismo presente no seu interior. Não foi constatado crescimento microbiano. O procedimento não foi realizado para a coluna carregada com ^{99}Mo por causa da alta atividade residual.

A TAB. 29 mostra que mesmo para a amostra não diluída, a técnica de contagem por *pour-plate* foi adequada. As contagens em UFC foram mais altas em quase todos os eluatos do gerador controle em relação ao gerador de 9,25 GBq. Uma quantidade maior foi encontrada nos eluatos do quinto dia e eluição exaustiva, indicando que é necessário um volume maior de eluição para extrair os microrganismos da coluna, desde que a coluna de alumina atua como uma barreira física. Como a quantidade inicial de *B. subtilis* na coluna era $3,6 \times 10^6$ UFC, as recuperações foram 0,53% e 53% para o gerador controle e de 9,25 GBq, respectivamente.

FIGURA 64 – Gráfico comparativo da recuperação (UFC) de *B. subtilis* no gerador controle e no gerador de 9,25 GBq.

6.7.6 Gerador com atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc e *B. pumilus*

O inóculo preparado (suspensão diluída de esporos de *B. pumilus*) a ser utilizado na coluna de alumina do gerador apresentou valor de absorbância $A = 0,570$ em 580 nm. Utilizando-se a Equação 6 para *B. pumilus*, calculou-se a concentração inicial. Assim, obteve-se $[B. pumilus] = 1,08 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$.

A TAB. 30 relaciona os resultados das 5 eluições realizadas no gerador de 9,25 GBq, após inoculação de *B. pumilus*.

TABELA 30 - Dados de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq (atividade nominal prevista de 250 mCi) inoculado com esporos de *B. pumilus*.

Eluição (dia)	Hora	^{99m} Tc (mCi) medido	^{99m} Tc (mCi) teórico	μCi ⁹⁹ Mo/ mCi ^{99m} Tc
1	10:46	388,0	388	0,012
2	10:14	270,0	305	0,003
3	9:46	134,7	140	0,003
4	9:43	96,6	106	0,014
5	10:15	75,0	76	0,006

A TAB. 31 relaciona os valores de Al e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador com atividade de 9,25 GBq.

TABELA 31 – Teor de alumínio e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador de 9,25 GBq inoculados com *B. pumilus*.

Eluição (dia)	Gerador controle		Gerador de 9,25 GBq	
	Al (μg mL ⁻¹)	pH	Al (μg mL ⁻¹)	pH
1	39,51	4,0	43,75	4,0
2	1,64	5,0	3,40	5,0
3	1,51	6,0	3,11	5,0
4	0,49	6,0	1,55	6,0
5	0,52	6,0	1,26	6,0

pH especificado: 4,5 – 7,5 (USP 37, 2014); 4,0 – 8,0 (EP 7, 2010).

Resultados semelhantes aos que ocorreram com o gerador de 9,25 GBq carregado com *B. subtilis* foram observados com o gerador de 9,25 GBq carregado com *B. pumilus*, com valores altos de concentração de alumínio e pH mais ácido na primeira eluição.

Na TAB. 32 são apresentados os resultados da recuperação de *B. pumilus* do gerador controle e do gerador inoculado com *B. pumilus* e atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc, durante cinco dias e eluição exaustiva.

TABELA 32 – Contagem em UFC por placa e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* para os eluatos do gerador controle e de 9,25 GBq.

Eluição (dia)	Gerador Controle										Gerador de 9,25 GBq									
	Diluição										Diluição									
	Não dil.		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		Não dil.		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
2	31	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Exaustiva	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total UFC	186 (0,003% de Recuperação)										NA									

A quantidade de *B. pumilus* inoculada nas colunas foi $5,4 \times 10^7$ UFC; Não diluído: eluato sem diluição; as contagens abaixo de 30 UFC não foram consideradas; todas as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Os resultados da TAB. 32, mostraram que o volume de 6 mL de cloreto de sódio 0,9% nas eluições diárias não foi suficiente para extrair os esporos de *B. pumilus*, seja pela própria barreira da coluna de alumina, como também pelo tempo decorrido entre uma eluição e outra. Diferentemente do *B. subtilis*, os esporos ficaram mais retidos na coluna e mesmo com a eluição exaustiva com 60 mL, não foi suficiente para extrair uma quantidade considerável de microrganismos. Decorridos cerca de 20 dias, a coluna controle também foi desmontada sob fluxo laminar e mergulhada em 200 mL solução tampão fosfato pH 7,2. Após agitação, foram tomados 20 mL e procedeu-se à filtração em membrana, que foi incubada em placa de TSA por 7 dias a 32 °C, para verificar se havia microrganismo viável presente no seu interior. Constatou-se a presença de 147 UFC, demonstrando que parte da carga microbiana permaneceu no interior da coluna de alumina.

Observou-se uma maior recuperação de *B. pumilus* no eluato sem diluição do gerador controle em vários dias em relação ao gerador de 9,25 GBq.

A FIG. 65 mostra um gráfico comparativo da recuperação de *B. pumilus* no gerador controle e no gerador de 9,25 GBq em relação ao inóculo inicial.

FIGURA 65 - Gráfico comparativo da recuperação (UFC) de *B. pumilus* no gerador controle e no gerador de 9,25 GBq.

6.7.7 Gerador com atividade nominal de 74 GBq de ^{99m}Tc e *B. pumilus*

A TAB. 33 relaciona os resultados das 5 eluições realizadas no gerador de 74 GBq inoculado com $1,08 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ de esporos de *B. pumilus*.

TABELA 33 - Dados de 5 eluições do gerador de 74 GBq (atividade nominal prevista de 2000 mCi).

Eluição (dia)	Hora	^{99m}Tc (mCi) medido	^{99m}Tc (mCi) teórico	$\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/$ $\text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$
1	15:15	1572	1572	0,6
2	15:05	1193	1236	0,196
3	9:43	919	927	0,270
4	9:52	483	474	0,325
5	9:22	347	380	0,527

Todos os valores da relação $\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/\text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$ apresentaram-se fora da especificação, o que pode ser explicado pela ausência no sistema de eluição dos filtros que retêm não somente o Al, como também o ^{99}Mo .

A TAB. 34 relaciona os valores de Al e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador com atividade de 74 GBq inoculado com *B. pumilus*.

TABELA 34 – Teor de alumínio e pH dos eluatos do gerador controle e do gerador de 74 GBq inoculados com *B. pumilus*.

Eluição (dia)	Gerador controle		Gerador de 74 GBq	
	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	pH	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	pH
1	35,95	4,0	48,38	4,0
2	3,17	5,0	12,32	5,0
3	1,80	6,0	8,99	5,0
4	0,77	6,0	20,67	5,0
5	0,88	6,0	8,96	6,0

pH especificado: 4,5 – 7,5 (USP 37, 2014); 4,0 – 8,0 (EP 7, 2010).

Os valores mais elevados de Al e pH mais ácido nos primeiros eluatos, além da presença de ^{99}Mo podem ser atribuídos à supressão da lavagem das colunas com 25 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% e à ausência dos filtros Millex[®] 0,22 μm e Sep-Pak[®] no sistema.

A TAB. 35 mostra a recuperação do *B. pumilus* do gerador controle e do gerador inoculado com *B. pumilus* e ^{99}Mo com atividade nominal de 74 GBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

TABELA 35 – Contagem em UFC do gerador controle e do gerador inoculado com *B. pumilus* com atividade nominal de 74 GBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Eluição (dia)	Gerador Controle										Gerador de 74 GBq									
	Diluição										Diluição									
	Não dil		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		Não dil.		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}	
1	0	0	0	7	0	0	1	11	2	4	0	22	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Exaustiva	7	12	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Total UFC	NA										NA									

A quantidade de *B. pumilus* inoculada nas colunas foi $5,4 \times 10^7$ UFC; Não diluído: eluato sem diluição; as contagens abaixo de 30 UFC não foram consideradas/ todas as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

A TAB. 35 mostra uma baixa ou nenhuma recuperação em todos os dias e diluições, inclusive na extração com 10 frascos de 6 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%.

A FIG. 66 ilustra um gráfico comparativo da recuperação de *B. pumilus* no gerador controle e no gerador de 74 GBq em relação ao inóculo inicial.

FIGURA 66 - Gráfico comparativo da recuperação (UFC) de *B. pumilus* no gerador controle e no gerador de 74 GBq.

Decorridos cerca de 20 dias, a coluna controle foi lavada com solução tampão fosfato pH 7,2 e procedeu-se à filtração em membrana e incubação para verificar se havia algum microrganismo presente no seu interior. A quantidade recuperada foi maior do que 300 UFC (fora do intervalo de contagem) mostrando que os esporos de *B. pumilus* possivelmente permaneceram aderidos ao leito da alumina do gerador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Mesmo com a concentração inicial de *B. pumilus* 15 vezes maior do que a concentração de *B. subtilis*, as recuperações dos esporos para os geradores controle, de 9,25 e 74 GBq foram inferiores à faixa de contagem. Outro ponto possível de ser considerado é se a morfologia e a configuração espacial de um esporo de *B. pumilus* poderiam implicar em uma maior aderência à alumina, em relação ao *B. subtilis* na forma vegetativa.

Os trabalhos de Bower et al.(1996) e Akutsu (2001) relatam que os esporos geralmente fixam-se às superfícies em taxa maior do que as células vegetativas porque o processo é facilitado por sua hidrofobicidade relativamente alta e morfologia, além das estruturas semelhantes a pelos que cobrem a superfície das paredes

dos esporos, apresentando resistência maior à ação de sanificantes (Bower et al., 1996; Akutsu, 2001).

6.7.8 Recuperação dos esporos do indicador biológico de *B. pumilus* (10^8 - 10^9 UFC mL⁻¹)

A contagem microbiana de cada segmento do indicador biológico com esporos de *B. pumilus* está relacionada na TAB. 36.

TABELA 36 - Contagens microbianas dos segmentos do indicador biológico de *B. pumilus*. Cada segmento recebeu 10 µL de uma suspensão de esporos de *B. pumilus* de $1,6 \times 10^9$ UFC mL⁻¹.

Segmento ¹	Sem diluição	Diluição 10 ⁻⁵	UFC médio
1	NA	53	7,2 x 10 ⁶
2	NA	95	
3	NA	78	
4	NA	62	

¹A quantidade de *B. pumilus* inoculada em cada segmento foi $1,6 \times 10^7$ UFC; NA: não aplicável (acima de 300 UFC); todas as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

A recuperação de 45% indicou que a superfície de sílica gel da tira de TLC-SG foi menos agressiva ao microrganismo do que a coluna de alumina.

6.7.9 Gerador com atividade nominal de 9,25 GBq e indicador biológico de *B. pumilus*

Os resultados de recuperação microbiana de cada segmento do indicador biológico de *B. pumilus* posicionado externamente à coluna do gerador de 9,25 GBq estão apresentados na TAB. 37.

TABELA 37 - Contagem microbiana e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* ao longo dos segmentos de um indicador biológico exposto ao gerador de 9,25 GBq.

Segmento ¹	Gerador Controle		Gerador de 9,25 GBq	
	Diluição		Diluição	
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	1068	52	314	39
2	306	205	351	31
3	456	87	329	42
4	744	137	610	58
UFC	NA	4,8 x 10 ⁷	NA	4,2 x 10 ⁶

¹A quantidade de *B. pumilus* inoculada em cada segmento foi 1,6 x 10⁷ UFC; NA: não aplicável (fora do intervalo de trabalho); todas as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Observou-se que o indicador biológico da coluna controle apresentou contagens de UFC significativamente maiores em relação à coluna com atividade radioativa. O segmento 4 que estava mais próximo à área com maior concentração radioativa no gerador de 9,25 GBq não apresentou diferença significativa em relação ao segmento 1. Este fato pode ser explicado devido ao deslocamento do ⁹⁹Mo e do ^{99m}Tc ao longo da coluna de alumina pelas eluições diárias provocando a irradiação do microrganismo.

Os dados obtidos de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq com indicador biológico de *B. pumilus* estão relacionados na TAB. 38, com valores dentro do especificado.

TABELA 38 - Dados de 5 eluições do gerador de 9,25 GBq com indicador biológico de *B. pumilus*.

Eluição (dia)	Hora	^{99m} Tc (mCi) medido	^{99m} Tc (mCi) teórico	μCi ⁹⁹ Mo/ mCi ^{99m} Tc
1	8:00	451	451	0,012
2	8:00	365	355	0,009
3	8:00	180	188	0,005
4	8:00	128	142	0,019
5	8:00	100	101	0,001

6.7.10 Gerador com atividade nominal de 74 GBq e indicador biológico de *B. pumilus*

Os resultados de recuperação microbiana de cada segmento do indicador biológico de *B. pumilus* posicionado externamente à coluna do gerador de 74 GBq estão apresentados na TAB. 39.

TABELA 39 - Contagem microbiana e estimativa da concentração bacteriana de *B. pumilus* ao longo dos segmentos de um indicador biológico exposto ao gerador de 74 GBq.

Segmento ¹	Gerador Controle		Gerador de 74 GBq	
	Diluição		Diluição	
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	652	91	98	9
2	382	88	84	6
3	428	51	89	5
4	327	53	91	12
UFC	NA	7,1 x 10 ⁶	9,1 x 10 ⁵	NA

¹A quantidade de *B. pumilus* inoculada em cada segmento foi 1,6 x 10⁷ UFC; NA: não aplicável (fora do intervalo de trabalho); todas as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Os dados obtidos de 5 eluições do gerador de 74 GBq com indicador biológico de *B. pumilus* estão relacionados na TAB. 40, com resultados dentro dos limites especificados.

TABELA 40 - Dados de 5 eluições do gerador de 74 GBq com indicador biológico de *B. pumilus*.

Eluição (dia)	Hora	^{99m}Tc (mCi) medido	^{99m}Tc (mCi) teórico	$\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/$ $\text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$
1	11:20	2050	2050	0,024
2	8:15	1085	1093	0,001
3	8:10	790	853	0,000
4	8:25	587	621	0,007
5	8:00	473	462	0,001

pH = 7,0

Da mesma maneira que no gerador de 9,25 GBq, observou-se que o indicador biológico da coluna controle apresentou contagens de UFC significativamente mais altas em relação à coluna do gerador de 74 GBq. Os resultados com o indicador biológico dos esporos de *B. pumilus* indicam uma provável inativação microbiana, em função da ação da radiação presente no gerador de 9,25 GBq e de 74 GBq.

A FIG. 67 mostra um gráfico comparativo das contagens (UFC) de *B. pumilus* nos geradores controle, no gerador de 9,25 e 74 GBq em relação ao indicador biológico inicial.

Contagem média por segmento no indicador biológico de esporos de *B. pumilus*. 1. Sem posicionar na coluna do gerador; 2. Gerador controle e gerador de 9,25 GBq; 3. Gerador controle e gerador de 74 GBq

FIGURA 67 – Gráfico comparativo das contagens do indicador biológico de *B. pumilus* nos geradores controle e nos geradores de 9,25 e 74 GBq em relação ao indicador biológico inicial.

As contagens médias por segmento não mostraram diferenças significativas entre si. Os indicadores biológicos das colunas radioativas de 9,25 e 74 GBq apresentaram recuperação entre 8,8-12,8 %, respectivamente, em relação às colunas controle. As recuperações dos indicadores biológicos das colunas controle de 9,25 e 74 GBq em comparação ao indicador biológico inicial foram entre 44,4-300 %, respectivamente.

Este experimento com o indicador biológico procurou minimizar a interferência da coluna de alumina, embora o efeito da sílica gel para os microrganismos deva ser considerado.

As diferenças entre as recuperações nos experimentos com microrganismos posicionados dentro e fora da coluna com ^{99}Mo podem ser atribuídas a diversos fatores, dentre eles, à barreira física da alumina (inoculação dentro da coluna), ao deslocamento de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ao longo da coluna provocado pela eluição diária causando irradiação do microrganismo e uma provável inativação microbiana. Variações no processo de produção e fatores experimentais, a saber, processo não automatizado de preparação da coluna de alumina sujeito a condições variáveis de material e

manipulação, diferenças no nível de compactação da alumina na coluna, preparação e quantificação do inóculo, realização das eluições, diluições das amostras (pipetagem e homogeneização), quantificação dos eluatos, experiência e treinamento do operador, também podem ter tido uma contribuição importante.

6.7.11 Geradores completos com atividade nominal de 9,25 GBq de ^{99m}Tc e *B. subtilis*

Na TAB. 41 estão apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados em dois geradores com atividade nominal de 9,25 GBq inoculados com *B. subtilis*. A escolha do *B. subtilis* para esta análise fundamentou-se nos resultados de experimentos anteriores em que ocorreu recuperação microbiana mais significativa do *B. subtilis* em relação ao *B. pumilus*. A TAB. 41 mostra as atividades radioativas medidas das soluções provenientes das lavagens das colunas, o teor de alumínio e o resultado do teste de esterilidade. Na TAB. 42, estão discriminadas as atividades de ^{99m}Tc , relação $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, teor de alumínio e resultados do teste de esterilidade provenientes das eluições diárias durante cinco dias.

TABELA 41 – Medidas das atividades radioativas das soluções provenientes das lavagens das colunas, teor de alumínio e resultado do teste de esterilidade.

Gerador 1	Atividade (mCi)	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Incubação TSB	Incubação Tioglicolato
Solução de lavagem	479,9	6,035	Crescimento (turvação do meio)	Crescimento (turvação do meio)
Primeiro eluato	20,89	1,625	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
Gerador 2	Atividade (mCi)	Al ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Incubação TSB	Incubação Tioglicolato
Solução de lavagem	470,9	4,992	Crescimento (turvação do meio)	Crescimento (turvação do meio)
Primeiro eluato	32,75	0,005	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento

Na rotina de produção, a lavagem das colunas é realizada antes da colocação da tampa com Sep-Pak® e filtro 0,22 µm, e observou-se crescimento microbiano no teste de esterilidade das soluções de lavagem, indicando que uma parte dos microrganismos foi extraída. Alíquotas retiradas com alça bacteriológica dos meios contaminados para placas de meio de cultura de TSA e para lâminas de vidro confirmaram a identidade do *B. subtilis* pela morfologia característica das colônias nas placas de TSA incubadas a 33 °C por três dias (FIG. 68), e teste de Gram. O teor de alumínio foi mais elevado no Gerador 1, com valor acima do limite especificado de 5 µg mL⁻¹ na farmacopeia europeia, mas dentro dos parâmetros da farmacopeia americana (10 µg mL⁻¹), enquanto que o resultado do Gerador 2 atende aos dois parâmetros. Os primeiros eluatos de cada gerador atenderam as especificações.

FIGURA 68 – Colônias características de *B. subtilis* em placa de TSA.

A TAB. 42 relaciona os dados das eluições dos dois geradores, concentração de Al nos eluatos e resultados do teste de esterilidade.

TABELA 42 - Atividades de ^{99m}Tc , relação $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, teor de alumínio e resultados do teste de esterilidade provenientes de eluições diárias por cinco dias.

Gerador 1						
Eluição (dia)	Hora	mCi ^{99m} Tc	μCi ⁹⁹ Mo/ mCi ^{99m} Tc	Al (μg mL ⁻¹)	Incubação TSB	Incubação tioglicolato
1	8:10	212	0,268	0,010	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
2	8:47	162	0,085	0,007		
3	8:58	129	0,028	0,008		
4	8:52	96	0,023	0,015		
5	8:55	76,8	0,018	0,015		
Gerador 2						
Eluição (dia)	Hora	mCi ^{99m} Tc	μCi ⁹⁹ Mo/ mCi ^{99m} Tc	Al (μg mL ⁻¹)	Incubação TSB	Incubação tioglicolato
1	8:18	216	0,280	0,004	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
2	9:02	167	0,073	0,009		
3	9:08	129	0,043	0,009		
4	9:02	101	0,011	0,011		
5	9:06	78,8	0,024	0,014		

Observou-se na TAB. 42 que a relação $\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}/ \text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$ apresentou resultados fora do especificado nos eluatos do primeiro dia de eluição segundo especificação USP (USP 37, 2014). Os resultados negativos no teste de esterilidade mostraram que a presença dos filtros foi fundamental para garantir a esterilidade do eluato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$). A apirogenicidade dos eluatos foi comprovada pelo método de formação de gel (LAL).

A incubação em meio de cultura de TSB das colunas e filtros retirados dos dois geradores após cerca de 40 dias confirmou a presença de microrganismos em ambos os materiais, demonstrando a eficiência dos filtros na retenção de contaminantes microbianos.

7. CONCLUSÕES

Os efeitos das doses de radiação nos acessórios (15, 25 e 50 kGy) e coluna de alumina do gerador (10, 15, 25 e 50 kGy), apesar de alguns resultados relatados de alteração na aparência, na estrutura e no desempenho dos materiais, não foram críticos ao objetivo proposto, demonstrando que a esterilização das colunas do gerador por irradiação com raios gama (^{60}Co) como uma alternativa à esterilização por calor úmido é factível sob o ponto de vista técnico e financeiro.

A dose de 25 kGy escolhida para a esterilização das colunas de alumina para os estudos dos geradores com atividades de 9,25 e 74 GBq mostrou-se adequada para a carga microbiana encontrada, e não foram constatadas alterações no desempenho e nos resultados das eluições dos geradores quando comparados às colunas não irradiadas.

Os métodos utilizados neste trabalho para quantificação e recuperação de suspensões de *B. subtilis* e esporos de *B. pumilus* mostraram-se adequados para os objetivos propostos.

Com base nos resultados de recuperação microbiana, observou-se que o *B. subtilis* na forma vegetativa apresentou menor afinidade pela coluna de alumina quando comparado aos esporos de *B. pumilus* e houve maior redução da viabilidade no gerador carregado com esporos de *B. pumilus*.

Pela observação das imagens em MEV da alumina das colunas irradiadas a 25 kGy e 50 kGy, verificou-se uma fragmentação maior na superfície cristalina o que, no caso dos sistemas de geradores montados com colunas irradiadas a 25 kGy, pode ter contribuído para uma maior adesão do microrganismo ao leito da alumina.

A presença de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ teve influência nos resultados de recuperação das colunas radioativas em relação às colunas controle, confirmando os cálculos dosimétricos realizados.

Os avanços conseguidos neste trabalho em relação aos trabalhos de Sorensen et al. (1977) e Allwood & McCarthy (1980) foram: a) uso de esporos que é a forma resistente e latente do *B. pumilus*; b) manipulação de uma espécie resistente à radiação gama (^{60}Co) diferentemente das espécies utilizadas nestes dois trabalhos; c) atividades de geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ significativamente mais altas; e d) a

proposição de um indicador biológico. Embora Allwood & McCarthy tenham postulado que a alumina é um ambiente hostil ao microrganismo, o mesmo não perdeu totalmente sua viabilidade durante o período de permanência no interior da coluna, pois foi recuperada uma quantidade não desprezível com a lavagem da coluna controle após 20 dias do carregamento. No caso dos geradores de 9,25 e 74 GBq, não se procedeu à lavagem posterior da coluna devido à dose de ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, e aos resíduos radioativos de meia-vida física longa.

O uso dos filtros Sep-Pak[®] e 0,22 μm no sistema da tampa do gerador é fundamental e eficiente, porque evita a passagem de microrganismos para o produto terminado (eluato do gerador), mesmo com carga microbiana elevada na coluna de alumina.

Sugestão de trabalho futuro

Utilização de técnica de imagem em Sistema de Imagem Pré-clínica PET/SPECT/CT, marca ALBIRA (Bruker/Oncovision, Espanha), instalado no Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP, para visualização do percurso de uma espécie bacteriana marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ao longo da coluna de alumina, em consequência das eluições diárias do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ e verificação da adesão do microrganismo à coluna de alumina.

APÊNDICE A – Critérios para avaliação da coluna para gerador

Nº do protocolo PV-P-001-00	Página de
<p align="center">Validação do Processo de Esterilização por Irradiação Gama. PARTE X. Avaliação de Desempenho dos Materiais Irrradiados.</p>		

Análises: Coluna de vidro com alumina para gerador

Objetivo

Avaliar os efeitos que a radiação gama - fonte ^{60}Co - na dose de 25 kGy pode promover nas colunas de vidro com alumina para gerador. Demonstrar a manutenção da qualidade, segurança e funcionalidade dos materiais irradiados, armazenados por 6 meses.

Condições Iniciais

As colunas irradiadas serão armazenadas por 6 meses e os testes a seguir serão realizados logo após a irradiação e a cada mês até completar o período de armazenamento. Serão avaliadas 10 unidades em cada teste.

Metodologia

1. Teste de Aparência

Verificar, visualmente, se houve alteração na cor e na aparência do vidro da coluna, como o aparecimento de trincas e/ou manchas; alteração no teflon e na placa de vidro sinterizado (se está solto ou descolado), verificar sulcos ou rachaduras no corpo da alumina. Para registro usar as letras SA - sem alteração e A - ocorrência de alteração.

1.1 Critério de aceitação

Aceitação: SA; Rejeição: A. No caso da cor, a irradiação escurece o vidro. Comparar com o padrão (foto). Critério de aceitação: atende ou não atende.

2. Teste de eluição

Verificar se houve alteração no tempo de eluição e no volume eluído utilizando um frasco de solução de cloreto de sódio 0,9% e um frasco a vácuo. Determinar o tempo de eluição (segundos) utilizando um cronômetro, e transferir o volume (mL) coletado em cada eluição para uma proveta graduada. Para registro anotar o volume e o tempo observados.

2.1 Critério de aceitação

A faixa de tempo de referência para eluição é de 30 a 50 segundos. O volume coletado deve estar na faixa de $6,0 \pm 0,5$ mL.

Para registro usar as letras SA - sem alteração e A - ocorrência de alteração.

3. Critério de Conformidade

Considera-se conforme (C) quando for encontrado até dois resultados de rejeição em 10 amostras analisadas.

Quando o número de rejeições for maior ou igual a 3, o critério de conformidade deverá considerar o número de rejeições na amostra não irradiada, ou seja, será considerado não conforme (NC) somente se o número de rejeições do lote irradiado exceder em duas unidades ao número de rejeições do lote não irradiado.

Referência de cor da coluna de vidro irradiada com raios gama (^{60}Co) e dose de 25 kGy

APÊNDICE B – Formulário para avaliação de estabilidade da coluna de gerador

Mês: _____

Data: ____/____/____

Coluna de vidro com alumina para Gerador						
Lote: _____						
Dose: ____kGy – (dose real: _____)						
Realização dos ensaios:						
Coluna	Alteração na aparência				Eluição	
	Cor	Trincas ou manchas	Teflon e placa de vidro	Sulco e rachadura na alumina	Tempo padrão (s)	Volume padrão (mL)
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
Critério de Aceitação	Comparar padrão	SA	SA	SA	SA	SA
C/NC*						

*Conforme/ Não conforme

Comentários:

Aprovado por:

Data:

Verificado por:

Data:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACECIL. Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. Disponível em: <<http://www.acecil.com.br>>. Acesso em: 02 dez. 2014.
- AHMED, S. N. ***Physics & Engineering of Radiation Detection***. 1st Ed. Oxford: Academic Press, 2007.
- AKUTSU, C. K. ***Adesão de esporos de Bacillus sporothermodurans ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado***. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ALLWOOD, M. C.; MCCARTHY, T. M. Microbial and pyrogenic contamination of molybdenum 99/technetium 99m radionuclide generators. ***Int. J. Pharm.***, v. 4, p. 185-193, 1980.
- BORICK, P. M.; FOGARTY, M. G. Effects of continuous and interrupted radiation on microorganisms. ***Appl. Microbiol.***, v. 15, n. 4, p. 785-789, 1967.
- BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. ***Trends in Food Sci. & Techn.***, v. 7, p. 152-156, 1998.
- BRAMBILLA, T. P. ***Estudo de materiais adsorvedores para o preparo de geradores de Ge-68/Ga-68***. 2013. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP, São Paulo.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. ***Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil***, ANVISA, Brasília, DF, 19 abr. 2010. p. 94.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 63, de 18 de dezembro de 2009. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Radiofármacos. ***Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil***, ANVISA, Brasília, DF, 23 dez. 2009. p. 73-75
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 64, de 18 de dezembro de 2009. Dispõe sobre o Registro de Radiofármacos. ***Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil***, ANVISA, Brasília, DF, 23 dez. 2009.
- BROCKMANN, H.; SCHODDER, H. Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption. ***Chem. Ber.***, v. 74, p. 73-78, 1941.

BRYANS, T.; ALEXANDER, K. Using recovery tests to assess bioburden procedures. **Medical Device and Diagnostic Industry**, 2002. Disponível em: <<http://www.mddionline.com/article/using-recovery-tests-assess-bioburden-procedures>>. Acesso em: 30 mai. 2013.

BURG, K. J. L.; SHALABY, S. W. Radiation sterilization of medical devices and pharmaceuticals. In: CLOUGH, R. L.; SHALABY, S. W. (Ed). **Irradiation of Polymers**. Fundamentals and Technological Applications. Washington DC: American Chemical Society, 1996. p. 240-245.

CALLISTER JR, W. D. **Materials Science and Engineering: an Introduction**. Tradução: SOARES, S. M. S. 5ª Ed., Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 2002.

CALVO, W. A. P. **Desenvolvimento do Sistema de Irradiação em um Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 Tipo Compacto**. 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP, São Paulo.

CASTIGLIA, S. G., SILVA, C. P. G., PEREIRA, N. S., ARAYA, G., MENDOZA, M., FREIRE, D. E VERDERA, S. **Manual de protocolos de calidad de radiofármacos – Producción y Control de Radiofármacos**. ARCAL XV, 1999.

CHIPARĂ, M. D.; CHIPARĂ, M. I. Effects of gamma irradiation on PTFE. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 37, p. 67-71, 1992.

CHU, R. D. H.; VANDYK, G. G. The effect of dose distribution on sterility assurance for gamma sterilized medical products. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 42, n. 4-6, p. 585-589, 1993.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2000.

CLONTZ, L. **Microbial Limit and Bioburden Tests – Validation Approaches and Global Requirements**. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

COBALT-60 DECAY SCHEME. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cobalt-60_Decay_Scheme.svg>. Acesso em: 29 jan. 2015.

DALY, M. J.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; VASILENKO, A.; ZHAI, M.; VENKATESWARAN, A.; HESS, M.; OMELCHENKO, M. V.; KOSTANDARITHES, H. M.; MAKAROVA, K. S.; WACKETT, L. P.; FREDRICKSON, J. K.; GHOSAL, D. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. **Science**, v. 306, p. 1025-1028, 2004.

DARMADY, E. M.; HUGHES, K. E. A.; BURT, M. M.; FREEMAN, B. M.; POWELL, D. B. Radiation Sterilization. **J. Clin. Path.**, v. 14, p. 55-58, 1961.

EUDRALEX, EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Vol. 4, Annex 1, Manufacture of Sterile Medicinal Products, Brussels, 2008.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 7. ed. (EP 7). Strasbourg: Council of Europe, v. 1, 2010.

EUROPEAN STANDARD. ***Sterilization of medical devices – Estimation of the population of micro-organisms on product***. Part 3: Guide to the methods for validation of microbiological techniques, Brussels, 1996. (EN 1174-3).

FARMACOPÉIA BRASILEIRA (FB 5), Vol. 1, 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

FUKUMORI, D. T. ***Desenvolvimento e Estudo de Materiais Termoluminescentes Baseados em Óxido de Alumínio para Aplicação em Dosimetria***. 2012. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

FUKUMORI, N. T. O. ***Determinação de Endotoxina Bacteriana (Pirogênio) em Radiofármacos pelo Método de Formação de Gel. Validação***. 2008. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

FUKUMORI, N. T. O.; CAMPOS, D. G.; MASSICANO, A. V. F.; PEREIRA, N. P. S.; SILVA, C. P. G.; MATSUDA, M. M. N. A portable test system for determination of bacterial endotoxins in ^{18}F -FDG, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and lyophilized reagents for labeling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. ***J. Nucl. Med. Tech.***, v. 39, p. 121-124, 2011.

GALBRAITH, W. D. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine. In: SMITH, B. T. (Ed). ***Nuclear Pharmacy. Concepts and Applications***. London: Pharmaceutical Press, 2010. p.110-186.

GAUTRIAUD, E.; STAFFORD, K. T.; ADAMCHUK, J.; SIMON, M. W.; OU, D. L. Effect of sterilization on the mechanical properties of silicone rubbers. ***Saint-Gobain Performance Plastics***, 2009. Disponível em: < www.biopharm.saint-gobain.com/en/products/WhitePapers/White%20Paper%20-%20Effect%20D2876.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2013.

GIL, E. S.; MATTOS, J. R. Métodos Calorimétricos. In: GIL, E. S. (Ed). ***Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos***. 2ª Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 375-377.

GIOIA, J.; YERRAPRAGADA, S.; QIN, X.; JIANG, H.; IGBOELI, O. C.; MUZNY, D.; DUGAN-ROCHA, S.; DING, Y.; HAWES, A.; LIU, W.; PEREZ, L.; KOVAR, C.; DINH, H.; LEE, S.; NAZARETH, L.; BLYTH, P.; HOLDER, M.; BUHAY, C.; TIRUMALAI, M. R.; LIU, Y.; DASGUPTA, I.; BOKHETACHE, L.; FUJITA, M.; KAROUIA, F.; MOORTHY, P. E.; SIEFERT, J.; UZMAN, A.; BUZUMBO, P.; VERMA, A.; ZWIYA, H.; McWILLIAMS, B. D.; OLOWU, A.; CLINKENBEARD, K. D.; NEWCOMBE, D.; GOLEBIEWSKI, L.; PETROSINO, J. F.; NICHOLSON, W. L.; FOX, G. E.; VENKATESWARAN, K.; HIGHLANDER, S. K.; WEINSTOCK, G. M. Paradoxical DNA Repair and Peroxide Resistance Gene Conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-

032. Issue 9, 2007. Disponível em: < www.plosone.org/search/simple?from=globalSimpleSearch&filterJournals=PLoSONE&query=Bacillus+pumilus&x=5&y=10.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2015.

GRANGER, A. C.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; DALY, M. J.; SETLOW, P. Effects of Mn and Fe levels on *Bacillus subtilis* spore resistance and effects of Mn²⁺, other divalent cations, orthophosphate, and dipicolinic acid on protein resistance to ionizing radiation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77(1), p. 32-40, 2011.

HAMMAD, A. A. Microbiological aspects of radiation sterilization. In: **Trends in Radiation Sterilization of Health Care Products**, Vienna: IAEA, 2008, p. 119-128.

HARLING, O. K.; KOHSE, G. E.; RILEY, K. J. Irradiation performance of polytetrafluoroethylene (Teflon®) in a mixed fast neutron and gamma radiation field. **J. Nucl. Mater.**, v. 304, p. 83-85, 2002.

HARWELL DOSIMETERS LIMITED. Disponível em: <http://www.harwell-dosimeters.co.uk/product-information/>. Acesso em: 05 mar. 2015.

HEMMERICH, Karl J. Polymer materials selection for radiation-sterilized products. **Medical Device and Diagnostic Industry**, 2000. Disponível em: <<http://www.mddionline.com/article/polymer-materials-selection-radiation-sterilized-products>>. Acesso em: 06 nov. 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª Ed., Porto Alegre: Bookman, 2009.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES. CENTRO DE RADIOFARMÁCIA (IPEN-CR). **A história da produção de radiofármacos no IPEN**. Disponível em: <http://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?seção_id=632&s=51>. Acesso em: 10 Jan. 2015.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES. CENTRO DE TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES (IPEN-CTR). Disponível em: <http://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?seção_id=676&s=54>. Acesso em: 02 Dez. 2014.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Guidelines for the Development, Validation and Routine Control of Industrial Radiation Processes**. IAEA Technology Series n.4. Vienna, 2013.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. A Code of Practice**. Vienna, 2007.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **Sterilization of health care products – Radiation**. Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, Switzerland, 2006. (ISO 11137-1).

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **Sterilization of health care products – Radiation**. Part 2: Establishing the sterilization dose, Switzerland, 2006. (ISO 11137-2).

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **Sterilization of health care products – Radiation**. Part 3: Guidance on dosimetric aspects, Switzerland, 2006. (ISO 11137-3).

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **Sterilization of health care products – Microbiological methods**. Part 1: Determination of the population of microorganisms on product, Arlington, 2006. (ISO 11737-1).

JERICÓ, M. C. **Aplicação do custeio baseado em atividades em um centro de material esterilizado**. 2008. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo – EFUSP, São Paulo. 197 p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

KRISKO, A.; RADMAN, M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 32, p. 14373-14377, 2010.

LAPPAN, U.; GEISLER, U.; HÄUßLER, L.; JEHNICHEN, D.; POMPE, G.; LUNKWITZ, K. Radiation-induced branching and crosslinking of poly(tetrafluoroethylene) (PTFE). **Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res B**, 185, p. 178-183, 2001.

MAHMOOD, A.; JONES, A. G. Technetium radiopharmaceuticals. In: WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. (Ed). **Handbook of Radiopharmaceuticals**. Radiochemistry and Applications. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2005. p. 323-362.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiol. Bras.**, v. 34, n. 4, p. 233- 239, 2001.

MAUSNER, L. F.; MIRZADEH, S. Reactor production of radionuclides. In: WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. (Ed). **Handbook of Radiopharmaceuticals**. Radiochemistry and Applications. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2005. p. 87-117.

MOELLER, R.; SETLOW, P.; HORNECK, G.; BERGER, T.; REITZ, G.; RETTBERG, P.; DOHERTY A. J.; OKAYASU, R.; NICHOLSON, W. L. Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from X rays and high-energy charged-particle bombardment. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 3, p. 1134-40, 2008.

NASSAU, K. ***The Physics and Chemistry of Color – The Fifteen Causes of Color***. New York: John Wiley and Sons, 1983. p. 184-202.

NASSAU, K. ***Gemstone Enhancement. Heat, Irradiation, Impregnation, Dyeing, and other Treatments which alter the Appearance of Gemstones, and the Detection of such Treatments***. London: Butler & Tanner Ltd., 1984. p. 53-54.

NORDION. Gamma Compatible Materials - Reference Guide. Canada, August 2011. Disponível em: <http://www.nordion.com/wp-content/uploads/2014/10/GT_Gamma-Compatible_Materials1.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2014.

NORRELL, S. A.; MESSLEY, K. E. ***Microbiology – Laboratory Manual – Principles and Applications***. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. ***Braz. J. Pharm. Sciences***, v. 42, n. 2, p. 151- 165, 2006.

OMI, N. M. ***Geração de um Aplicativo para Simulação de Doses em Sistemas de Irradiação Gama***. 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP, São Paulo.

OSHIMA, A.; TABATA, Y.; KUDOH, H.; SEGUCHI, T. Radiation induced crosslinking of polytetrafluoroethylene. ***Radiat. Phys. Chem.***, v. 45, n. 2, p. 269-273, 1995.

OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. ***The handbook of radiopharmaceuticals***. London: Chapman & Hallmedical, 1995.

PARISI, A. N.; ANTOINE, A. D. Characterization of *Bacillus pumilus* E601 spores after single sublethal gamma irradiators treatments. ***Appl. Microbiol.***, v. 29, n. 1, p. 34-39, 1975.

PARISI, A.; ANTOINE, A. D. Increased radiation resistance of vegetative *Bacillus pumilus*. ***Appl. Microbiol.***, v. 28, n. 1, p. 41-46, 1974.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. ***Microbiologia Conceitos e Aplicações***. Vol. 1, 2^a Ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEPPER, R. E.; BUFFA, N. T.; CHANDLER, V. L. Relative resistance of microorganisms to cathode rays. III. Bacterial spores. ***Appl. Microbiol.***, v. 4, p. 150-152, 1956.

PETRIK, M.; SCHUESSELE, A.; PERKHOFER, S.; LASS-FLÖRL, C.; BECKER, D.; DECRISTOFORO, C. Microbial challenge tests on nonradioactive TiO₂-based ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator columns. ***Nucl. Med. Commun.***, v. 33, p. 819-82, 2012.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. ***Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos***. 3^a Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

POUR-PLATE TECHNIQUE. Disponível em:

<https://learning.uonbi.ac.ke/courses/SBT202/scormPackages/path_2/1423_pour_plate.html>. Acesso em: 05 Jan. 2015.

PRINCE, H. N. Stability of Bacillus pumilus spore strips used for monitoring radiation sterilization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 31, n. 6, p. 999-1000, 1976.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática – Roteiro e Manual**. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

SAGHEE, M. R.; SANDLE, T.; TIDSWELL, E. C. **Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices**. 1st Ed. New Delhi: Business Horizons, 2011.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 5th Ed. New York: Springer, 2003.

SAMPSON, C. B. **Textbook of Radiopharmacy**. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1990.

SHALABY, S. W.; LINDEN JR, C. L. Radiochemical sterilization: a new approach to medical device processing. In: CLOUGH, R. L.; SHALABY, S. W. (Ed). **Irradiation of Polymers**. Fundamentals and Technological Applications. Washington DC: American Chemical Society, 1996. p. 246-253.

SHANI, G. **Radiation Dosimetry - Instrumentation and Methods**. Department of Nuclear and Biomedical Engineering, Ben Gurion University; 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press, 2001.

SINGH, R.; GUPTA, P.; PUROHIT, S.; KUMAR, P.; VAIJAPURKAR, S. G.; CHACHARKAR, M. P. Radiation resistance of the microflora associated with amniotic membranes. **World J. Microbiol. Biotechn.**, v. 22, p. 23-27, 2006.

SOLIMAN, Y. S.; BESHIR, W. B.; ABDEL-FATTAH, A. A.; ABDEL-REHIN, F. Dosimetric Studies for Gamma Radiation Validation of Medical Devices. **Appl. Rad. and Isot.**, v. 71, p. 21-28, 2013.

SORENSEN, K.; KRISTENSEN, K.; FRANDSEN, P. Microbial contamination of radionuclide generators. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 2, p. 105-107, 1977.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TABLE OF RADIOACTIVE ISOTOPES, Nuclide Search –Table of Radioactive Isotopes ENSDF, Ernest Orlando Lawrence, Berkeley National Laboratory. Disponível em: <<http://nucleardata.nuclear.lu.se/nucleardata/toi/radSearch.asp>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

TAKEHISA, M.; SHINTANI, H.; SEKIGUCHI, M.; KOSHIKAWA, T.; OONISHI, T.; TSUGE, M.; SOU, K.; YAMASE, Y.; KINOSHITA, S.; TSUKAMOTO, H.; ENDO, T.; YASHIMA, K.; NAGAI, M.; ISHIGAKI, K.; SATO, Y.; WHITBY, J. L. The radiation resistance of the bioburden from medical devices. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 52, n. 1-6, p. 21-27, 1998.

TAVARES, A. T. **Determinação Multielementar de Metais-traço em Radiofármacos produzidos na Diretoria de Radiofarmácia por Espectrometria de Emissão por Plasma**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 37. ed. (USP 37). Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2014.

THRALL, J.H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5^a Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAMPUZ, A.; PIPER, K. E.; STECKELBERG, J. M.; PATEL, R. Effect of gamma radiation on viability and DNA of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, v. 55, p. 1271-75, 2006.

UNGER, L. M.; TRUBEY, D. K. *Specific Gamma-Ray Dose Constants for Nuclides Important to Dosimetry and Radiological Assessment*. ORNL/RSIC-45/R1; Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, 1982.

VICHENEWSKI, W. Cromatografia por adsorção. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. p. 87-101.

WEATHERMAN, K. D. Nuclear pharmacy practice. In: SMITH, B. T. (Ed). **Nuclear Pharmacy**. Concepts and Applications. London: Pharmaceutical Press, 2010. p. 87-109.

ZAIDI, H.; SGOUROS, G. **Therapeutics Applications of Monte Carlo Calculations in Nuclear Medicine**. London: IOP Publishing Ltd, 2003.

ZHONG, X.; YU, L.; SUN, J.; ZHANG, Y. Radiation stability of PTFE irradiated under various conditions. *Polymer Degrad. and Stability*, v. 39, p. 187-191, 1993.

ZOLLE, I. Performance and quality control of the ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generator. In: ZOLLE, I. (Ed). **Technetium-99m Pharmaceuticals**. Berlin: Springer, 2007. p. 77-93.

ZUMDAHL, S. S. **Chemical Principles**. 2nd Ed. Lexington: D. C. Heath and Company, 1995.