UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Estudo da esterilização por plasma de acoplamento indutivo e
análise comparativa com esterilização por óxido de etileno**

Michelle Rigamonti Boscariol

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus A. Pinto

SÃO PAULO
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Estudo da esterilização por plasma de acoplamento indutivo e
análise comparativa com esterilização por óxido de etileno**

Michelle Rigamonti Boscariol

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus A. Pinto

SÃO PAULO
2006

Michelle Rigamonti Boscariol

**Estudo da esterilização por plasma de acoplamento indutivo e
análise comparativa com esterilização por óxido de etileno**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Professora Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/ presidente

Professora Patrícia Santos Lopes
1º examinador

Professora Célia Hitomi Yamamoto
2º examinador

São Paulo, 10 de agosto de 2006

DEDICO

*Aos meus pais, meus melhores amigos, que admiro muito, **Jesuel e Edna**, por todo apoio, dedicação, carinho e amor;*

*Às minhas irmãs **Grazielle e Daniella**, grandes amigas de todas as jornadas;*

*À professora **Terezinha**, que pacientemente me orientou com muita sabedoria, competência, dedicação, carinho e respeito;*

*A **Deus** presente em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro do projeto de mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudo.

Ao amigo e companheiro de trabalho *Adir José Moreira*, pela ajuda na realização dos ciclos, manipulação do equipamento e pela orientação e incentivo.

À amiga *Débora Cristina de Oliveira* pela amizade, companheirismo, incentivo e orientação, e pelo apoio no preparo dos Indicadores Biológicos e nos processos de Esterilização com o equipamento Óxido de Etileno.

Ao amigo *Juliano de Moraes Ferreira Silva* companheiro de trabalho e disciplinas.

Às professoras *Telma M. Kaneco* e *Mitsuko T. Ohara*, pelas sugestões no decorrer do mestrado, em especial a professora *Telma* pelas contribuições no decorrer da disciplina e da monitoria.

Aos colegas da Escola Politécnica de Engenharia LSI/PSI da Universidade de São Paulo, em especial ao Professor *Ronaldo Domingues Mansano* pelo apoio e orientação, ao Professor *Luís da Silva Zambon* pelo empréstimo do equipamento e *Nelson Ordonez, José Antônio Rodrigues Porto, Alexandre Marques Camponucci* e *Elísio José de Lima* pelo suporte técnico.

Ao Instituto de Física pelo empréstimo do Microscópio Eletrônico de Varredura (*SEM – Scan Electronic Microscopic*), em especial a *Fernanda* e *Maria Cecília*, pelo suporte técnico.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos e em especial a *José de S. Sobrinho, Satiko Kikuchi, Siliane Bertoni Kalkaslied de Souza, Aline Moraes de Oliveira, Miriam Cristina Sakuragui Matuo*, onde cada um, de uma maneira diferente, apoiou-me no desenvolvimento do projeto.

Ao colega *Cláudio Borges Bonato* que atenciosamente ajudou na elaboração de parâmetros de processo, funcionamento e manipulação do equipamento de esterilização por Óxido de Etileno.

Ao técnico *Valmor Rizzatti* da empresa *Starclave* que atenciosamente ajudou na manutenção do equipamento de esterilização por Óxido de Etileno.

À *Mônica Inês Casajus* pela análise estatística dos resultados e pelo carinho e atenção.

Aos bibliotecários do Conjunto das Químicas pelo constante apoio e pela revisão

das referências bibliográficas, em especial à *Leila Aparecida Bonadio* pela dedicação e atenção.

À Coordenadoria do Programa de Pós –Graduação em Fármacos e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e aos funcionários *Elizabeth Claro S. Paiva*, *Jorge de Lima*, *Elaine Midori Ychico* e *Majô*, pela atenção.

Aos Professores *Mário Julio Ávila Campos* do Instituto de Ciências Biomédicas, *Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco*, *João Carlos Monteiro de Carvalho*, *Humberto Gomez Ferraz*, *Vladi Olga Consiglieri* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e *Myriam Krasilchik* da Faculdade de Educação, pela colaboração dos conhecimentos fornecidos no decorrer das disciplinas realizadas.

Aos meus cunhados *Sérgio D. Faria* e *André Luis dos Santos*, e meu namorado *Maurício Rocha de Magalhães Sampaio* pela amizade, apoio e compreensão neste período da minha vida.

À amiga *Andréia Aparecida Fávaro* pelo companheirismo e amizade e a Professora *Nilsa Sumie Yamashita Watt* pelo incentivo da realização do mestrado.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Em âmbito hospitalar é crescente o emprego de dispositivos confeccionados de distintos materiais termossensíveis. Assim, o emprego de métodos esterilizantes compatíveis tem sido o foco de muitas pesquisas, dentre as quais destacam-se estudos envolvendo o plasma. O mecanismo de ação deste desenvolve-se com a aplicação de Rádio-Frequência a gases precursores, resultando na inativação microbiana por espécies altamente reativas. Este método inovador caracteriza-se por não gerar riscos de toxicidade ocupacional e aos pacientes, e ser processado em temperatura próxima ao ambiente. Para análise comparativa foi utilizado o método de esterilização por óxido de etileno (agente químico na forma gasosa). Este gás apresenta características de elevada inflamabilidade, explosividade e toxicidade, por isso é usado diluído em gases inertes, além de deixar residual no material esterilizado, necessitando um controle rigoroso no processo de aeração; porém atualmente é um dos métodos mais utilizados para esterilização de materiais odontológico-hospitalares, particularmente os termossensíveis. O principal objetivo deste trabalho foi estudar diferentes parâmetros do processo e seus respectivos resultados, que influenciam na esterilização empregando plasma e compará-los com os obtidos empregando óxido de etileno. O equipamento utilizado para o estudo dos processos de esterilização por plasma foi o ICP (*Inductively Coupled Plasma*). Analisou-se assim para o plasma algumas distintas combinações de parâmetros, tais como: gases (oxigênio puro e mistura deste com peróxido de hidrogênio a 5,10 e 20%), pressão (330 mTor), vazão do gás (100sccm), temperatura (próxima ao ambiente), potência de rádio-frequência (300, 350 e 400W), tempos de exposição (com intervalos de 3 a 60 min) e umidade relativa ($80\pm 5\%$). No ICP foram desenvolvidas duas fases planejadas para os processos, seguindo uma programação experimental, já no óxido de etileno foram realizadas três séries de exposições sub-letais utilizando mistura esterilizante Oxyfume® 2002 (10% Óxido de Etileno, 63% HCFC 124 e 27% HCFC 22), sendo os parâmetros padronizados: umidade relativa (40 a 60%), concentração do gás (450 mg/L), temperatura (55°C) e tempos de exposição (com intervalos de 3 a 15 min). Todos os ciclos foram realizados em triplicata. Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 foram obtidos a partir de suspensões de microrganismos e inoculados em suportes na concentração de 10^7 UFC/suporte para serem utilizados nos estudos dos processos de esterilização. Empregou-se a técnica de *Pour Plate* (incubação em estufa por 24 horas a 37°C) para a quantificação dos esporos. Para o processo de esterilização por plasma os resultados obtidos forneceram valores D que variaram entre 3 e 8 min, dependendo dos parâmetros testados, e para o processo de esterilização por óxido de etileno o Valor D foi de 2,80 min. Concluiu-se que o processo de esterilização por plasma apresentou resultados interessantes e promissores e os melhores resultados foram obtidos com as potências maiores de 350 e 400W para o gás oxigênio puro, caracterizando o plasma como alternativa promissora de esterilização, devido às suas características positivas frente ao óxido de etileno, pois os valores D entre os dois processos de esterilização não apresentaram uma diferença significativa.

ABSTRACT

The gas Plasma sterilization technology has been emerging as an alternative to conventional low temperature processes since the advent of new therapies using heat sensitive materials in the healthcare field is greater than ever. The gas Plasma mechanism of action includes the generation of active species by an electrical discharge, which is able to promote lethal effect on microorganisms. The sterilization techniques using gas plasma are under intense investigation and it has already been demonstrated by recent studies that this technology is simple, cost-effective, suitable for microbicidal activity and absent of toxic residuals. Ethylene oxide is the sterilization agent most widely applied to medical devices. However, its explosiveness, inflammability and toxicity led to the search for other sterilization methods at low temperature and it has been used associated to non active gases which inhibit these properties and it is necessary to have the control at the occupational safety and environmental monitoring. Therefore, the aim of this work was to explore possible microbicidal application of the gas plasma sterilization generated by an inductively coupled system and to compare this sterilization method with ethylene oxide (chemical substance in gaseous form), observing their D value. It was used distinct combinations of process parameters to sterilization by plasma, as follows: radio-frequency powers (300, 350 and 400 Watts), exposition times (in the range of 3 to 60 minutes), gas (pure oxygen and mixture with hydrogen peroxide 5, 10 and 20%), gas flow (100 sccm), pressure (330 mTorr), temperature (close to the environmental one) and relative humidity 80±5%. For ethylene oxide, Oxyfume 2002[®] was used (mixture of ethylene oxide, HCFCs 22 and 124), under the concentration of 450mg/L, at the temperature of 55°C and relative humidity of 50±5% and it was submitted to a time of exposition between 3 to 15 minutes. Both processes were submitted to exposition cycles in triple. *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculated in a standard load of 10⁷ spores per carrier was used as biological indicator. After the exposition, the biological indicator's spore survivors were counted by the "Pour Plate" technique (incubation temperature of 35 ± 2°C for 24 hours). Significant microbial reduction was observed in some cases where the plasma D value was between 3 and 8 min and 3,08 min, 3,04 min to 350 and 400W powers respectively. In the ethylene oxide process the D value was 2,80 min. These results evidenced the higher effectiveness of ethylene oxide comparatively to plasma. However the latter presents advantages that make it an interesting alternative to low temperature sterilization processes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Testes desafios com indicadores biológicos (<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372), sob variação de parâmetros para observação do comportamento do equipamento ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>).	51
Tabela 2:	Etapas (fases) da programação experimental dos desafios dos indicadores biológicos (<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372), sob diferentes combinações de variáveis (ICP).	52
Tabela 3:	Valores utilizados para análise estatística do plasma.	92
Tabela 4:	Médias e desvios padrão de D por tipo de gás (%H ₂ O ₂).	93
Tabela 5:	Médias e desvios padrão de D por potência.	93
Tabela 6:	Médias e desvios padrão de D por %H ₂ O ₂ e potência.	95
Tabela 7:	Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D.	98
Tabela 8:	Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D,300W.	99
Tabela 9:	Intervalos de confiança de Tukey, 300W.	99
Tabela 10:	Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D,350W.	100

Tabela 11:	Intervalos de confiança de Tukey, 350W.	101
Tabela 12:	Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D,400W.	102
Tabela 13:	Intervalos de confiança de Tukey, 400W.	102
Tabela 14:	Valores utilizados para análise estatística do ETO e plasma.	112
Tabela 15:	Médias e desvios padrão de D para O ₂ puro: 350 e 400 Watts e Óxido de Etileno.	112
Tabela 16:	Resultados da Análise de variância de um fator.	113
Tabela 17:	Comparação entre processos de esterilização mais utilizados atualmente.	116

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC com o emprego do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob distintas condições. 61,62,63,64
- Quadro 2:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e gás oxigênio. 66
- Quadro 3:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e gás oxigênio. 67
- Quadro 4:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e gás oxigênio. 68
- Quadro 5:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 5% de peróxido de hidrogênio). 69
- Quadro 6:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o

emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 5% de peróxido de hidrogênio).

70

Quadro 7: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 5% de peróxido de hidrogênio).

71

Quadro 8: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 10% de peróxido de hidrogênio).

72

Quadro 9: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 10% de peróxido de hidrogênio).

73

Quadro 10: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 10% de peróxido de hidrogênio).

74

- Quadro 11:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 20% de peróxido de hidrogênio). 75
- Quadro 12:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 20% de peróxido de hidrogênio). 76
- Quadro 13:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 20% de peróxido de hidrogênio). 77
- Quadro 14:** Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do processo de esterilização por Óxido de Etileno em diferentes tempos. 106
- Quadro 15:** Comparação dos valores D obtidos durante todo o trabalho. 111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Foto do equipamento ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>).	47
Figura 2:	Desenho esquemático do ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>).	48
Figura 3:	Fluxograma das atividades desenvolvidas.	56
Figura 4:	Curva de Letalidade do processo com o gás Oxigênio puro (primeira fase) na potência de 300W, pressão 330mTorr, vazão de gás 100sccm, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20, 40 e 60 minutos, com Valor D.	79
Figura 5:	Curva de Letalidade do processo com o gás Oxigênio puro (primeira fase) na potência de 350W, pressão 330mTorr, vazão de gás 100sccm, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minutos, com Valor D.	79
Figura 6:	Curva de Letalidade do processo com o gás Oxigênio puro (primeira fase) na potência de 400W, pressão 330mTorr, vazão de gás 100sccm, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minutos, com Valor D.	80
Figura 7:	Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 300W, pressão 330mTorr, vazão de gás 95 sccm para oxigênio e 5 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.	80

- Figura 8:** Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 350W, pressão 330mTorr, vazão de gás 95 sccm para oxigênio e 5 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 81
- Figura 9:** Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 400W, pressão 330mTorr, vazão de gás 95 sccm para oxigênio e 5 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 81
- Figura 10:** Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 300W, pressão 330mTorr, vazão de gás 90 sccm para oxigênio e 10 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 82
- Figura 11:** Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 350W, pressão 330mTorr, vazão de gás 90 sccm para oxigênio e 10 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 82
- Figura 12:** Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 400W, pressão 330mTorr, vazão de gás 90 sccm para oxigênio e 10 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 83
- Figura 13:** Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 300W, pressão 330mTorr, vazão de gás 80 sccm para oxigênio e 20 sccm para

peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 83

Figura 14: Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 350W, pressão 330mTorr, vazão de gás 80 sccm para oxigênio e 20 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 84

Figura 15: Curva de Letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 400W, pressão 330mTorr, vazão de gás 80 sccm para oxigênio e 20 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D. 84

Figura 16: Indicadores Biológicos constituídos por *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados em lamínulas de vidro de dimensões 18x18mm. 87

Figura 17: Tubo de quartzo da câmara de sistema plasma por acoplamento Indutivo. 88

Figura 18: Esporo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 isolado antes da exposição ao processo esterilizante empregando plasma. 88

Figura 19: Colônia de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 não submetida ao desafio com plasma. 89

Figura 20: Esporo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, empregando plasma, com potência de 300W e período de 60 minutos (destruição da parede celular). 89

Figura 21:	Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 350W e período de 40 minutos.	90
Figura 22:	Esporo de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 400W e período de 20 minutos.	90
Figura 23:	Médias de D por % de H ₂ O ₂ (para todas as potências) (dados da Tabela 4).	93
Figura 24:	Médias de D por potência (para todas os tipos de gás) (dados da Tabela 5).	94
Figura 25:	Médias de D para cada potência. Oxigênio puro.	94
Figura 26:	Valores individuais de D para cada combinação de %H ₂ O ₂ (gás) e potência.	96
Figura 27:	Intervalos de 95% de confiança das médias de D para cada combinação pe potência e %H ₂ O ₂ .	96
Figura 28:	Médias de D para cada potência e %H ₂ O ₂ (1).	97
Figura 29:	Médias de D para cada potência e %H ₂ O ₂ (2).	97
Figura 30:	Médias (em azul) e valores individuais (em vermelho) de D por %H ₂ O ₂ 300W.	98
Figura 31:	Médias de D por %H ₂ O ₂ , 350W.	100
Figura 32:	Médias de D por %H ₂ O ₂ , 400W.	101

- Figura 33:** Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 300W e período de 40 minutos em 90sccm de Oxigênio e 10sccm de peróxido de hidrogênio. 103
- Figura 34:** Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 350W e período de 40 minutos em 90sccm de oxigênio e 10sccm de peróxido de hidrogênio. 104
- Figura 35:** Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 400W e período de 40 minutos em 95sccm de oxigênio e 5sccm de peróxido de hidrogênio. 104
- Figura 36:** Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 400W e período de 20 minutos em 80sccm de oxigênio e 20sccm de peróxido de hidrogênio. 105
- Figura 37:** Curva de letalidade do processo por esterilização com óxido de etileno em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos, com Valor D. 107
- Figura 38:** Colônias de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 não submetida ao desafio com EtO. 108
- Figura 39:** Esporo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 antes de submetido ao desafio com EtO. 108
- Figura 40:** esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo por EtO no período de 15 minutos (disco de papel). 109

- Figura 41:** Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo por EtO no período de 15 minutos (disco de papel). 109
- Figura 42:** Médias (em azul) e valores individuais (em vermelho) de D por grupo, para os grupos: O₂ puro 300W, O₂ puro 400W e Óxido de Etileno. 113
- Figura 43:** Box Plot de D por grupo, para os grupos: O₂ puro 300W, O₂ puro 400W e Óxido de Etileno. 114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ICP - *Inductively Coupled Plasma*;
- EtO – Óxido de Etileno;
- LSI - Laboratório de Sistemas Integráveis;
- SAL - *Sterility Assurance Level*;
- FDA - *Food and Drug Administration*;
- RIE - *Reactive Ion Etching*;
- RF - Rádio-Frequência;
- PVC – Poli (Cloroeto de Vinila);
- OSHA - Occupational Safety and Health Administration;
- UFC - Unidades Formadoras de Colônias;
- int. – Intervalos;
- IB – Indicadores Biológicos;
- TSA – Tryptone Soya Agar;
- W – Watts;
- sccm – *standart cubic centimeter* (centímetro cúbico padrão);
- SEM - *Scan Electronic Microscopic* (Microscópio Eletrônico de Varredura);
- ATCC – *American Type Culture Collection*;
- n.d. – não detectado;

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Processos Esterilizantes.....	25
2.2. Esterilização por Plasma	29
2.3. Esterilização por Óxido de Etileno	33
2.4. Indicador Biológico.....	37
3. OBJETIVO	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Materiais	41
4.2. Métodos	41
4.2.1. Obtenção das Suspensões de Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372	41
4.2.1.1. Repiques de Manutenção	41
4.2.1.2. Obtenção de Esporos	42
4.2.1.3. Acompanhamento do Grau de Esporulação	43
4.2.1.4. Recolhimento e Lavagem dos Esporos.....	43
4.2.2. Padronização das Suspensões de Esporos.....	44
4.2.3. Preparação dos Inóculos em Suportes	45
4.2.4. Ciclos Laboratoriais de Exposição ao Plasma	46
4.2.5. Ciclos Laboratoriais de Exposição ao Gás Óxido de Etileno.....	52
4.2.6. Contagem Microbiana	53
4.2.7. Acompanhamento da Letalidade e Resistência	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a tecnologia avança com extrema rapidez. Em paralelo, no âmbito da saúde, ocorrem intensas alterações. A situação hoje predominante nos hospitais envolve o uso de técnicas e instrumentais avançados (geralmente termossensíveis), com procedimentos “minimamente” invasivos contrapondo-se a cirurgias amplas e de longa duração; depara-se também com microrganismos altamente resistentes, em parte devido ao emprego abusivo da antibioticoterapia, e, os pacientes encontram-se muitas vezes imunodeprimidos, seja devido a determinada patologia ou mesmo a medicação, ou ainda criticamente doentes e/ou debilitados pela faixa etária elevada. Assim a necessidade do emprego de processos esterilizantes que compatibilizem com materiais termossensíveis é a maior de todos os tempos.

A seleção de um agente esterilizante ideal exige o atendimento a determinadas características, a começar por ausência de corrosão, não promoção de alterações em nível molecular na estrutura dos materiais, alta difusibilidade através de substâncias porosas e materiais de embalagem, facilidade de remoção dos resíduos, abrangência na eficácia da letalidade microbiana. Ainda, é necessário que este agente possua baixa toxicidade ao ser humano, ausência de inflamabilidade, facilidade de estocagem e pronta disponibilidade (OLIVEIRA, 2000; MOISAN et al., 2001).

O óxido de etileno possui a maioria dessas características, entretanto aspectos de inflamabilidade e toxicidade impulsionam à busca de soluções que o tornem mais seguro sob estes dois aspectos. Esta necessidade tem levado à pesquisa de misturas com gases inertes a fim de minimizar ou eliminar riscos de

explosão, assim como à exigência de instalações adequadas, de forma a possibilitar seu manuseio e emprego seguro.

O uso de óxido de etileno continua sendo bastante intenso, porém existem muitos estudos sobre propriedades carcinogênicas apresentadas pelos materiais esterilizados por este método, afetando a segurança de pacientes e operadores (OLIVEIRA, 2000). Paralelamente, alternativas estão sendo idealizadas e mesmo utilizadas em processos de esterilização físico-química a baixa temperatura, entre os quais métodos que utilizam formaldeído líquido ou glutaraldeído (RUSSEL, 1982). Outra tecnologia empregada em esterilizações sob baixa temperatura é a radiação gama, porém esta apresenta um alto custo tanto pelas instalações, quanto pelos recursos de segurança que devem ser utilizados. As grandes intensidades de energia necessária para a esterilização podem afetar as propriedades dos polímeros promovendo a degradação das cadeias poliméricas ou a formação de ligações cruzadas, o que reduz a vida útil destes materiais ou compromete sua funcionalidade (RUTALA et al., 1999).

Entre as possibilidades, a mais promissora e revolucionária, consiste no emprego do Plasma como processo esterilizante (JACOBS, 1994). Embora já se tenha nos últimos anos divulgado e inclusive comercializado equipamentos atrelados ao emprego do plasma, com ênfase para o Plazlyte® (Abtox) (BRYCE et al., 1997) e Sterrad® (J&J) (HELMELIN et al., 1998), há controvérsias a serem esclarecidas.

No âmbito da tecnologia, há que se estudar o efeito da composição do gás de origem do plasma na letalidade dos esporos (LEROUGE et al., 2000), já que nos equipamentos comercialmente disponíveis o plasma é mero agente complementar de detoxificação do agente ativo principal, ou seja, o peróxido de hidrogênio ou ácido peracético (KREBS et al., 1998; KUCHMA et al., 1996).

É fundamental, portanto, o conhecimento dos mecanismos de geração do plasma (GADRI et al., 2000) e seu modo de ação. Apenas desta forma a busca do agente esterilizante ideal, de alta eficácia, atividade rápida, compatibilidade, atoxicidade e que seja custo-efetivo (RUTALA & WEBER, 1996) poderá ser de fato investigada, com respostas acima de tudo pautadas no conhecimento científico.

Este estudo foi parcialmente realizado em equipamento de esterilização por Plasma, empregando ICP (*Inductively Coupled Plasma* – Plasma por Acoplamento Indutivo), desenvolvido no Laboratório de Sistemas Integráveis (LSI) do Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Já os ciclos empregando óxido de etileno foram realizados no equipamento da marca SERCON Ind. Com. Ap. Méd. Hosp. LTDA, modelo HS E 39/40 HETO 3000, disponível no Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Durante o desenvolvimento dos processos de esterilização por óxido de etileno e plasma, no decorrer das validações, tornou-se fundamental o uso de indicadores biológicos como instrumento de controle. Estes traduzem diretamente a efetividade do ciclo esterilizante em termos da letalidade dos microrganismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Processos Esterilizantes

Esterilização é um termo que implica na inativação total de microrganismos, constatada mediante a perda de sua capacidade reprodutiva, embora não necessariamente implique na destruição de todas suas enzimas, de seus produtos metabólicos, toxinas etc (MOURA et al., 1998).

Numa outra abordagem, esterilização é o processo que tem por objetivo destruir todas as formas de vida com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de conservação e de utilização do produto. A manutenção do nível de esterilidade conferido a um produto garante o prolongamento da sua vida útil e depende das etapas de pré-esterilização, de esterilização e pós-esterilização. Os métodos de esterilização permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas em produtos farmacêuticos, odonto-médico-hospitalares e alimentícios (MARQUES, 2002).

Na esterilização o que realmente ocorre é a remoção ou morte dos microrganismos seguindo uma função probabilística, ou seja, sempre havendo a possibilidade de se encontrar alguns microrganismos intactos sobreviventes no sistema. Então, o processo esterilizante, bem como outros cuidados preliminares, visa minimizar essa possibilidade, na tentativa de atingir o “*Sterility Assurance Level*” (SAL), ou nível de segurança de esterilidade pré-definido (PINTO et al., 2003).

O procedimento esterilizante selecionado para atingir o nível de segurança de esterilidade estabelecido para determinado produto dependerá grandemente da

natureza desse produto e da carga microbiana inicial (*"bioburden"*) presente no mesmo (PINTO et al., 2003).

A esterilização pode ser efetuada através da aplicação do calor úmido, que envolve a desnaturação protéica, a coagulação de proteínas e de enzimas, bem como a fusão de lipídeos da membrana celular; ou pelo calor seco, quando a morte é principalmente um processo de oxidação, havendo necessidade do emprego de temperaturas mais elevadas em períodos mais longos (MOURA et al., 1998).

O método esterilizante por calor úmido na forma de vapor saturado sob pressão é o mais largamente utilizado. A esterilização a vapor apresenta como características: ausência de toxicidade, ausência de resíduos, baixo custo, fácil controle, elevado poder esporicida e compatibilidade com vasta gama de materiais, sendo usado para itens resistentes ao calor e umidade (FERRAZ, 1997; ISHISAKI, 1998).

O processo esterilizante por calor seco, diferentemente do úmido, não envolve transmissão de calor latente, portanto exige temperaturas mais elevadas para atingir o nível de esterilidade requerido. Este processo é recomendado para materiais que possam ser danificados pelo calor úmido ou que não permitem sua penetração, como pós, produtos oleosos e alguns instrumentos perfuro-cortantes. As vantagens incluem alto poder de penetração, poucas variáveis a controlar e baixo custo, sendo que a maior desvantagem é a utilização de temperaturas e tempos elevados (MARQUES, 2002).

Um outro método de esterilização é por irradiação, esta pode ser: particulada (raios alfa, raios beta, prótons e neutrons) e eletromagnética (raios X, raios gama e luz ultravioleta) (PINTO et al., 2003).

As radiações esterilizantes promovem dupla quebra nas fitas do DNA dos microrganismos, impedindo sua regeneração e bloqueando sua replicação. Os danos causados às outras partes dos microrganismos são de pequena relevância para o processo de esterilização por meio de radiações (MOURA et al., 1998).

No geral as radiações particuladas apresentam menor poder de penetração e são menos efetivas como agentes esterilizantes do que as eletromagnéticas. Apenas os elétrons acelerados têm encontrado aplicação prática e crescente, à medida que os equipamentos mais modernos superam limitações quanto à penetrabilidade, ainda que em elevado investimento (PINTO et al., 2003).

Nas aplicações da esterilização por irradiação, incluem-se alguns materiais poliméricos, vitaminas, antibióticos e frascos de vidro, havendo, porém, a necessidade de verificação de incompatibilidade e cuidadoso estudo de estabilidade com investigação inclusive toxicológica, pois a radiação ocasiona degradações e modificações estruturais em vários produtos. Particularmente no caso de muitos dos materiais odonto-médico-hospitalares de natureza polimérica, apesar do processo ocorrer a temperaturas reduzidas e de estabilizantes incorporados, a formação de radicais livres, ligações cruzadas e duplas ligações ocasionam alterações mecânicas e visuais que impossibilitam muitas vezes a aplicação de tal processo (OLIVEIRA, 2000).

O fato de que materiais termossensíveis são, com frequência, também susceptíveis a alterações moleculares quando submetidos à irradiação, ocasiona uma grande parcela de produtos cuja única opção de processo esterilizante consiste na esterilização empregando agente químico na forma gasosa. A esterilização também pode ser obtida através de certos compostos químicos em solução ou sob a forma de vapor. Os esterilizantes químicos são compostos altamente reativos

quando empregados em concentração e quantidade adequadas e agem dissolvendo lipídeos da membrana celular (detergentes, solventes e lipídeos) ou por desnaturação de proteínas (certos agentes oxidantes e alquilantes) (MOURA et al., 1998).

A pesquisa de método químico esterilizante adequado foi iniciada em decorrência da necessidade de esterilização dos dispositivos odonto-médico-hospitalares e farmacêuticos constituídos em plástico, sensíveis ao calor e também à radiação. Dentre muitos gases pesquisados, o óxido de etileno e o formaldeído são poderosos agentes alquilantes e exercem efeito letal nos microrganismos por alquilação de proteínas, DNA e RNA (PINTO et al., 2003).

O processo de esterilização por óxido de etileno caracteriza-se por certa complexidade, englobando diversos parâmetros que necessitam de controle, a saber: temperatura, concentração de gás, pressão, umidade relativa, tempo de exposição e tempo de aeração, este último imprescindível para a remoção dos resíduos de gás do produto esterilizado (OLIVEIRA, 2000).

Também no reprocessamento de materiais odonto-médico-hospitalares, aspecto que se constitui em grande preocupação nos hospitais, o óxido de etileno tem sido o esterilizante de escolha. Entretanto, a freqüente inexistência de instalações adequadas, seja no próprio hospital ou em empresas que oferecem serviços de terceirização, tem acarretado a busca de alternativas. A “*Food and Drug Administration*” (FDA) tem sugerido processo de esterilização por ácido peracético, plasma de peróxido de hidrogênio (Sterrad®), plasma de ácido peracético (Abtox®) e vapor de peróxido de hidrogênio (HOFMANN et al., 2005). Entretanto, as novas tecnologias apresentam aplicações limitadas, devendo o seu emprego ocorrer com conhecimento quanto às vantagens e restrições. Conceitualmente, aplica-se

a situações específicas no âmbito hospitalar, não extrapoláveis a indústria (OLIVEIRA, 2000).

2.2. Esterilização por Plasma

O uso do Plasma oferece uma alternativa original de esterilização devido às propriedades intrínsecas deste meio. O método consiste em expor microrganismos a espécies originadas de uma descarga elétrica no gás de origem. Neste método o gás ou gases envolvidos na obtenção do plasma, os precursores, não são exigidos quanto apresentarem efeito biocida a não ser que sejam ativados por descarga elétrica. As espécies reativas não mais estarão presentes depois de alguns milissegundos do campo elétrico ter sido desligado, o que significa não haver necessidade de utilização de equipamento de segurança e, portanto, baixo risco para o pessoal envolvido no processo.

Segundo Moore (1989), a palavra Plasma foi primeiramente utilizada em 1928 por Langmuir, que trabalhou com descargas de baixas pressões, que são agora comuns em tubos fluorescentes e sinais de néon. Nestas descargas, a luminosidade conduzida pelo gás espalhava-se pelo Tubo de Descarga. Langmuir introduziu a palavra plasma para descrever o gás ionizado.

Lerouge et al. (2000), destacam a importância da tecnologia do gás plasma estar sendo incrivelmente estudada na aplicação como alternativa de método de esterilização a baixa temperatura para materiais biomédicos. Posicionam esta tecnologia como promissora, pois age rapidamente e não deixa residuais tóxicos.

As condições de operação do plasma tendem a serem ajustadas para uma

eficiente inativação dos microrganismos enquanto minimizam o dano aos materiais submetidos a este tratamento.

Os plasmas empregados para esterilização são frios e constituem-se de gases ionizados; consistem de íons, elétrons, partículas livres, tais como átomos, moléculas e radicais (átomos ou átomos agregados com elétrons emparelhados, quimicamente reativos), coletivamente chamados neutros (ANDERSON, 1989).

Íons e átomos neutros (moléculas) podem estar num estado agitado, isto é, eles podem ter energia interna (BACKGROUND INFORMATION, 1996); esta energia pode ser zero, quando estas partículas estão em seus estados mais estáveis. Quando ativadas, as partículas podem perder sua energia interna, tanto espontaneamente pela emissão de um fóton ou por colisões com outras partículas, ou com a superfície.

Plasmas artificiais são usualmente produzidos submetendo-se um gás ou gases a campos eletromagnéticos, tanto por corrente contínua, campo ou amplitude alternada (usualmente campo de alta frequência), designados descargas elétricas (MOISAN, 2001).

O campo elétrico acelera as partículas carregadas, essencialmente os elétrons, já que os íons são mais pesados e o gás é finalmente levado ao estado de plasma por colisões dos elétrons com as partículas pesadas. Como uma regra em descargas elétricas, a maior parte do volume de gás é luminosa, originando descargas luminescentes; quando a descarga acontece, algumas das espécies produzidas na região da luminescência podem ser carregadas junto à corrente elétrica e obtém-se o que é chamado curso pós-luminescente. A esterilização por plasma pode ser concretizada na região luminescente ou pós-luminescente. Comparando as regiões, a pós-luminescente contém relativamente menos

partículas carregadas, compreendidas essencialmente de átomos neutros, radicais e moléculas, algumas das quais em estado excitado (MOISAN, 2001).

Os processos de plasma podem ser caracterizados por meio de um sistema de espectrometria de emissão e são baseados na emissão de fótons das espécies excitadas. Durante os processos de plasma os elétrons de um átomo ou molécula podem ganhar energia suficiente para passar para um nível mais energético, onde ficam em órbita durante certo intervalo de tempo e em seguida decaem para um nível de menor energia. Durante o processo de decaimento ocorre perda de energia por parte desse elétron, sendo que a energia pode ser emitida em forma de fótons. A espectroscopia de emissão é uma técnica não intrusiva, pois não exige contato com o plasma e ainda assim permite realizar medidas em tempo real (D'AGOSTINO, 1990).

Esta técnica de espectroscopia de emissão é muito utilizada para caracterizar processos de plasma em geral como deposição ou ataque químico de diversos materiais cerâmicos e poliméricos.

Em processo de plasma que envolve materiais orgânicos há um acompanhamento da evolução do oxigênio e seus compostos como o dióxido de carbono, permitindo visualizar de forma qualitativa como está ocorrendo o ataque químico (CHAU et al., 1996).

Segundo Moisan (2001), há três mecanismos básicos envolvidos na inativação de microrganismos por plasma: (A) destruição direta por radiação UV de material genético dos microrganismos; (B) erosão dos microrganismos, átomo por átomo, por foto-desordenação decorrente da irradiação UV, formando componentes voláteis na combinação de átomos intrínsecos aos microrganismos; (C) erosão dos microrganismos, átomo por átomo, por cauterização, para formar

componentes voláteis como resultado de combustão lenta. Em alguns casos a cauterização é adicionalmente ativada por fótons UV, aumentando o índice de inativação dos microrganismos. Estes mecanismos fazem com que a esterilização por plasma seja totalmente diferente das técnicas clássicas de esterilização e sugerem seu uso para inativar agentes infecciosos não convencionais tais como príons.

A esterilização por plasma pode ser obtida através de dois equipamentos: plasma de acoplamento capacitivo ("*Reactive Ion Etching*" - RIE) e plasma de acoplamento indutivo ("*Inductively Coupled Plasma*" - ICP) (COBURN, 1982; CHAPMAN, 1980). Em ambos os processos, tanto no sistema de acoplamento capacitivo quanto no de acoplamento indutivo, são avaliados os efeitos sobre indicadores biológicos, sob combinações de parâmetros de processo, tais como pressão e intensidade de rádio-frequência (RF), além da natureza do gás inserido no sistema, responsável pela diversidade de entidades do plasma.

O plasma de acoplamento indutivo é um método já existente, que possui outras finalidades nas pesquisas; consiste em técnica analítica utilizada na detecção de traços de metais em amostras. A primeira finalidade deste plasma é obter elementos para emitir características de comprimento de onda leves e específicos que podem ser medidos. A tecnologia deste método foi primeiramente empregada no começo de 1960 com a intenção de melhorar a superfície do cristal, havendo a seguir crescimento desta técnica (BRADFORD et al., 1997).

Segundo Bradford e Cook (1997), o plasma de acoplamento indutivo pode ser utilizado nas análises de quantificação para materiais naturais como as rochas, minerais, solo, sedimento da atmosfera, água, planta e tecido de animal; geoquímica

pura e aplicada, mineralogia, agricultura, silvicultura, química ecológica e pesquisas na indústria de alimentos.

As principais vantagens deste sistema são: a completa ausência de eletrodos metálicos no interior da câmara de processos, a menor intensidade do campo eletromagnético do plasma, menor ataque iônico e efeito dos radicais gerados no plasma, nos processos de esterilização (LEROUGE, et al. 2000).

2.3. Esterilização por Óxido de Etileno

O emprego de vapores de óxido de etileno como agente esterilizante consiste em procedimento alternativo ao uso de agentes físicos que, comparativamente, são microbicidas eficientes, porém mais agressivos (ALFA et al., 1997). Caracteriza-se por ação bactericida, esporicida, virucida e fungicida, agindo por alquilação não específica de radicais químicos como hidroxila (OH), amina (NH₂) e sulfidril (SH), com perda do hidrogênio e formação de grupo alquil-hidroxila. Esses radicais encontram-se presentes em vários componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, enzimas e outros, de menor relevância para a ação microbicida. A reação com o óxido de etileno pode levar à interrupção de atividades metabólicas e reprodutivas e, conseqüentemente, injúria ou morte celular (OLIVEIRA, 2000).

O óxido de etileno pode se comportar como gás à temperatura ambiente, ou líquido a temperatura abaixo de seu ponto de ebulição. Seus vapores apresentam características de flamabilidade e explosividade quando em contato com pequena quantidade de ar, da ordem de 3%, e na presença de certos catalisadores (ATKINS & PAULA, 2002). Em razão dessas características, é freqüentemente

misturado com outros gases inertes a fim de alcançar misturas esterilizantes não inflamáveis, assim como não explosivas. Os gases inertes mais comumente utilizados têm sido o clorofluorcarbono 12 ou diclorodifluormetano (CFC-12), o dióxido de Carbono (CO_2), o nitrogênio (N_2), e em proposta mais recente, os hidroclorofluorcarbonos (HCFCs) (BARD INTERNATIONAL, 1990).

Atualmente uma mistura esterilizante disponível comercialmente é a Oxyfume 2002®, fornecida pela White Martins, em cilindros de 150 kg, uma das opções de volume além de 62 kg e 11 kg, na mistura de óxido de etileno, HCFC 124 e HCFC 22, respectivamente nas proporções de 10%, 63% e 27% (V/V).

O grande mérito do uso do óxido de etileno em processos esterilizantes de produtos termossensíveis decorre da sua aplicação abrangente, inclusive com relação a materiais incompatíveis com radiação esterilizante. Entre esses produtos encontram-se os artigos odonto-médico-hospitalares, fabricados em grande parte com materiais poliméricos.

Uma etapa fundamental que é necessário estabelecer durante o processo, consiste no processo de aeração dos materiais esterilizados, sendo de importância fundamental na remoção de resíduos de óxido de etileno e seus subprodutos, etileno-cloridrina e etileno-glicol (BURGUES & REICH, 1993). Cuidados adicionais devem ser tomados com relação a itens odonto-médico-hospitalares usados diretamente em pacientes. Devido a sua natureza altamente reativa e tóxica, inúmeros problemas têm sido relatados, como episódios de anafilaxia pelo contato com sangue de pacientes, queimaduras químicas e inflamação crônica no emprego de implantes teciduais e ósseos, dificuldade respiratória, prurido, urticária, febre, hipotensão, parada cardíaca e mesmo a morte em determinadas situações (BRUICE, 1998; BROWN, 2000).

O processo pode ser realizado em câmara com parâmetros definidos ou sala sob condições ambientais, exigindo longo período de tempo e inserindo risco de não ser atingida a efetividade necessária. O modo mais seguro e eficiente na remoção de resíduos consiste no emprego de aerador mecânico, com acompanhamento de tipo e número de trocas de ar, bem como temperatura (OLIVEIRA, 2000).

Os parâmetros pré-estabelecidos para o processo influenciam grandemente o tempo requerido para a remoção dos resíduos. A temperatura exerce impacto significativo, proporcionando redução no tempo total de aeração quando a 60º C, comparativamente a 50º C.

Propriedades inerentes ao material devem ser consideradas, como composição, espessura, configuração, densidade e material de embalagem. Metais não porosos e vidro não absorvem óxido de etileno e, portanto, não requerem aeração, desde que esterilizados sem embalagem. Materiais como tecido e papel retêm o gás e necessitam aeração. O cloreto de polivinila (PVC) tem sido identificado como sendo o tipo de material de maior dificuldade na aeração (OLIVEIRA, 2000).

O óxido de etileno é um gás extremamente reativo, que à temperatura e pressão ambientes, apresenta ausência de cor e odor, este último somente detectável quando atingidas concentrações da ordem de 700 ppm, nível este muito acima do limite indutor de efeitos tóxicos (BRYCE, 1998). Os efeitos nocivos podem ser de natureza diversa, como irritação ocular, dérmica e respiratória, náuseas, vômitos, depressão do sistema nervoso central e mesmo morte, sendo que maior preocupação tem sido direcionada às suas propriedades mutagênicas, além de possivelmente carcinogênicas e teratogênicas. Por estas razões, em 1984, a “Occupational Safety and Health Administration” (OSHA) estabeleceu limite de

1 ppm ambiental para jornada de trabalho diária de 8 horas, sendo que posteriormente foi acrescentado limite para exposição a curto prazo de 5 ppm. Além disso, há considerações de que esse tipo de limite pode ser criticável, uma vez que níveis menores podem causar trocas entre cromátides irmãs (OLIVEIRA, 2000).

Em humanos, exposição ocupacional a óxido de etileno tem sido relacionada com aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs e formação de micronúcleos em células sanguíneas (BOLT, 1996).

A existência de unidade de esterilização por óxido de etileno em grande parte dos hospitais no nível mundial resulta em potencial risco de exposição de inúmeros trabalhadores. O treinamento do pessoal envolvido quanto à execução correta de procedimentos de operação e uso de equipamentos de segurança são fatores primordiais para se reduzir riscos de exposição desnecessários.

A efetividade do processo esterilizante por óxido de etileno depende de uma conjugação de fatores microbiológicos, físicos e químicos. Assim, o controle inicial diz respeito à carga microbiana inerente ao produto, originada parcialmente da própria matéria-prima e do seu processamento com diferentes graus de automação e barreiras; do nível de higiene, motivação e treinamento do pessoal envolvido, assim como do ambiente onde é processado; todos responsáveis pelo “*bioburden*” ou biocarga do processo. Esta questão é inerente a qualquer processo esterilizante.

Consiste também em parte inerente do processo o protocolo de validação. A validação inclui itens relativos ao equipamento, instalações e inclui qualificação do desempenho físico, microbiológico e certificação da validação. Enquanto na qualificação física todos os parâmetros pertinentes às etapas de pré-condicionamento, da exposição à condição esterilizante na câmara assim como da aeração são considerados, na qualificação microbiológica é considerado em

especial o desafio dos monitores biológicos, além do “*bioburden*” (ANSI/AAMI, 1988).

2.4. Indicador Biológico

Os indicadores biológicos constituem-se no recurso ideal para monitoração de processos esterilizantes do tipo destrutivo, pois traduzem diretamente a eficácia do processo.

Uma vez que o objetivo de qualquer processo esterilizante é a morte dos microrganismos presentes no produto, o mecanismo mais adequado para constatar a eficácia do processo é traduzido pela letalidade, sendo os esporos bacterianos, os principais constituintes dos indicadores biológicos (HAYAKAWA et al., 1998). Eles são capazes de integrar todos os parâmetros envolvidos: tempo, concentração do agente ativo, temperatura, umidade relativa, pressão, além de condições de embalagem, uma vez que podem ser alocados internamente às embalagens dos produtos a serem esterilizados (OLIVEIRA, 2000).

A resistência dos esporos bacterianos deve ser obrigatoriamente superior à dos microrganismos originalmente presentes no material a ser esterilizado, em geral formas vegetativas bacterianas, chamados de carga natural do produto ou “*bioburden*”. Os esporos são inoculados em suportes apropriados a partir de suspensão padronizada em número de aproximadamente 10^6 UFC/suporte (ANSI/AAMI, 1986).

A cepa microbiana empregada na monitoração do processo esterilizante deve, preferencialmente, apresentar determinadas características, a saber: elevada resistência frente a particular processo esterilizante, ausência de

patogenicidade, fácil identificação, condições específicas de crescimento, não ser produtora de pirogênio e permitir fácil padronização. É também desejável que apresente alguma característica que a distinga de contaminações acidentais, sendo que o *Bacillus subtilis* apresenta pigmento alaranjado quando cultivado em meios apropriados (MARQUES, 2002).

As bactérias do gênero *Bacillus* quando se encontram em condições ambientais desfavoráveis, são capazes de originar formas de repouso denominadas esporos, com alta resistência a agentes físicos e químicos. Esta propriedade de resistência possibilita sua escolha como indicador biológico. A maioria das teorias que tentam elucidar os mecanismos de resistência dos esporos fundamenta-se na estrutura e localização de determinados componentes. O esporo geralmente é esférico, altamente refringente, composto de várias camadas concêntricas (GANESAN, 1986).

No centro do esporo está o protoplasma da célula vegetativa remanescente, contendo DNA, RNA, enzimas e demais componentes que serão utilizados na germinação. Ao redor do protoplasma localiza-se a membrana interna, que durante a esporulação sintetiza as camadas adjacentes, que constituem a parede celular. Externamente à parede celular localiza-se o córtex, composto basicamente por peptoglicano e ácido dipicolínico, associado a íons cálcio, sendo que este ácido compõe em cerca de 15% da base seca do esporo. Ao redor do córtex tem-se uma membrana externa e uma parede trilaminada que confere forma, suporte físico e proteção contra enzimas (MURRAY, 1995).

Esporos de *Bacillus subtilis* são mais freqüentemente utilizados como indicadores biológicos para processos de esterilização, por ser este o organismo conhecido mais resistente e mais fácil de manipular (FERRAZ, 1997).

Este microrganismo quando examinado microscopicamente consiste de células de 0,7 a 0,8µm de largura e 2 a 3µm de comprimento; os endoesporos são ovais e centrais e as células não são intumescidas. Quando incubados aerobicamente em meio apropriado a 30-35° C, o crescimento ocorre em 24 horas, enquanto utilizando-se meio similar inoculado e incubado a 55-60°C não mostram evidência de crescimento no mesmo intervalo de tempo. As colônias cultivadas em ágar têm aparência opaca e podem ser creme ou marrom e quando incubadas em caldo nutriente desenvolvem uma película e pequena ou nenhuma turbidez (MARQUES, 2002).

Na bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, o processo de esporulação leva aproximadamente 7 horas quando a 37°C e resulta de uma divisão celular assimétrica, diferindo das divisões celulares simétricas (fissão binária), característica do crescimento vegetativo (TORTORA et al, 2003).

3. OBJETIVO

1. Estudo da esterilização por plasma.
2. Desenvolvimento de processo de esterilização por plasma.
3. Análise comparativa entre o método de esterilização por plasma e óxido de etileno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Neste experimento, diferentes combinações de variáveis do processo de esterilização por plasma foram analisadas: natureza do gás inserido no sistema, pressão, vazão do gás, temperatura, potência, período de exposição e modo de geração do plasma. O equipamento utilizado no processo foi o ICP (*Inductively Coupled Plasma*), desenvolvido no Laboratório de Sistemas Integráveis (LSI) do Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

No experimento com esterilização por óxido de etileno, os parâmetros fixos foram: concentração do gás, umidade relativa e tipo de mistura gasosa, e como variável foram contemplados os períodos de exposição do processo.

Para garantir o estudo da eficácia dos processos através de indicador biológico, esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 foram obtidos no laboratório e a seguir suspensão dos mesmos padronizada quanto à carga microbiana, veiculados em suportes constituídos de discos de papel (1x1cm) e lamínulas de vidro de 1,8 cm x 1,8 cm e acondicionados em placas de Petri do mesmo material.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção das Suspensões de Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372

4.2.1.1. Repiques de Manutenção

Foi utilizada cepa de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, cujos repiques de manutenção foram feitos em tubos de ensaio contendo ágar para

dosagem de antibióticos n° 1 (Merk®), em superfície inclinada, esterilizados em autoclave. A incubação dos tubos inoculados foi efetuada na temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Decorrido este tempo, foi transferida, em condições assépticas, uma alçada do tubo inclinado para volume de 100 mL de caldo caseína-soja (Difco®), estéril e contido em tubo de ensaio de 37 x 200 mm. A incubação foi seguida idêntica às condições do repique de manutenção.

4.2.1.2. Obtenção de Esporos

Da suspensão anterior, 5 mL foram inoculados em garrafas de *Roux* contendo 200 mL de ágar para esporulação, cuja composição é: extrato de levedura, caldo nutriente, sulfato de manganês tetrahidratado, cloreto de cálcio hexahidratado, ágar e água destilada (OLIVEIRA, 2000).

Trabalhou-se simultaneamente com quatro garrafas de *Roux*, as quais foram esterilizadas em autoclave (121°C , 15 minutos) em ciclo único, e também inoculadas a partir da suspensão do repique de manutenção, contida em tubo único.

Em continuidade, a incubação das quatro garrafas foi a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e, diariamente, providenciada a remoção de massa microbiana, utilizando-se alça de platina estéril, para confecção de esfregaços e acompanhamento do grau de esporulação.

Este procedimento, sempre envolvendo quatro garrafas de *Roux*, foi executado em seis réplicas, as quais originaram os grupos de suspensão de esporos de I a VI.

4.2.1.3. Acompanhamento do Grau de Esporulação

Os esfregaços obtidos a partir da massa microbiana foram fixados e submetidos à coloração com solução saturada de verde malaquita e solução aquosa de safranina (BIER, 1977).

O procedimento se constituiu na aplicação de solução saturada de verde malaquita sobre o esfregaço, mantida por 10 minutos sob leve aquecimento, seguindo-se lavagem com água destilada, aplicação da solução de safranina por 30 segundos, enxágüe com água destilada e secagem.

Após a contagem de pelo menos 10 campos microscópicos para cada garrafa, foi determinada a porcentagem de esporos em relação ao total de células vegetativas. Quando o grau de esporulação atingiu cerca de 95%, a incubação foi interrompida.

A suspensão de esporos das garrafas de *Roux* foi recolhida, respeitando os grupos distintos, a partir do valor mínimo de 95% de esporulação, dentro de 12 a 15 dias de incubação.

4.2.1.4. Recolhimento e Lavagem dos Esporos

A massa celular resultante do crescimento no ágar foi recolhida de cada garrafa com 30 mL de água destilada estéril, com o auxílio de pérolas de vidro e passando a suspensão obtida por filtro constituído de quatro camadas de tecido de poliéster estéril. Foram feitas sucessivas lavagens com água destilada estéril e centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos, utilizando centrífuga marca Fanem® modelo 205 N. O material centrifugado foi retomado em cerca de 40 mL de

água destilada estéril, e transferido para erlenmeyer de 125 mL (OLIVEIRA, 2000).

A fim de eliminar possíveis microrganismos na forma vegetativa, contaminantes ou não, cada erlenmeyer contendo suspensão de esporos sofreu tratamento térmico em banho-maria a $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos. Os erlenmeyers contendo esporos oriundos de cada conjunto de quatro garrafas de *Roux* foram então mantidos em “freezer” a cerca de -10°C até o próximo estágio.

4.2.2. Padronização das Suspensões de Esporos

Cada grupo de suspensão de esporos, recolhidos e lavados conforme anteriormente descrito foi, então, considerado para a etapa de padronização, mantendo-se a denominação de Grupos I, II, III, IV, V e VI.

Todos os seis erlenmeyers foram descongelados naturalmente, permitindo agregar em um único frasco todo o volume da suspensão de esporos, originando então o “pool” de esporos.

Após 30 minutos de homogeneização, a suspensão resultante foi transferida para frascos estéreis de 125 mL providos de tampa, em alíquotas de 10 mL para cada frasco. Esta subdivisão permitiu que se obtivesse 25 frascos com conteúdo uniformizado.

A contagem dos esporos foi realizada em três dos frascos, escolhidos aleatoriamente, e denominados 1, 2 e 3, sendo que os resultados obtidos foram extrapolados para os 22 frascos restantes, tendo em vista a condição de uniformidade entre os mesmos (OLIVEIRA, 2000).

O procedimento foi iniciado com a promoção de choque térmico (70°C por 15 minutos), seguindo-se diluições decimais em água destilada estéril, sendo as

diluições de 10^{-6} a 10^{-11} submetidas à contagem, em triplicata, pela técnica de semeadura em profundidades “*Pour Plate*”, usando cerca de 15 mL de ágar caseína-soja estéril por placa. Após solidificação, foi adicionada superficialmente uma camada extra de 5 mL do mesmo meio de cultura estéril, de forma a originar um selo ou “*overlay*”, possibilitando a uniformização da disponibilidade de oxigênio às colônias bacterianas, e em decorrência da sua morfologia, otimizando a contagem. A incubação das placas foi na posição invertida em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 72 horas, seguindo-se contagem do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) (UNITED..., 2002).

4.2.3. Preparação dos Inóculos em Suportes

Cada fração padronizada obtida anteriormente, contendo 10 mL, foi descongelada e diluída na proporção de 1 mL da suspensão para 9 mL de água destilada estéril, obtendo dez novos tubos no total, contendo a solução diluída de 10 vezes. Estes foram utilizados para inóculo simultâneo de grupo de indicadores biológicos, permitindo a obtenção total de aproximadamente 800 unidades inoculadas.

O fluxo laminar foi utilizado para dispensar o inóculo (com pipeta automática calibrada) na razão de 0,1 mL por suporte e acondicioná-los em placas de Petri de vidro (com tampa) constituindo cada lamínula e disco de papel inoculados e protegidos um indicador biológico (três em cada placa). Em cada suporte havia uma concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC. Estes foram utilizados, paralelamente como grupos de desafio no processo de esterilização por plasma (lamínula de vidro) e com o óxido de etileno (disco de papel) (UNITED..., 2002).

4.2.4. Ciclos Laboratoriais de Exposição ao Plasma

Para a realização dos processos de esterilização nesta etapa, foi utilizado o microrganismo *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 como indicador biológico e como gases de processo, o oxigênio puro e este associado com o peróxido de hidrogênio (mistura de gases).

O ICP (figura 1) é composto de um tubo de quartzo horizontal com diâmetro de 15 cm e comprimento 1,2 m, o qual é circundado por uma bobina de rádio-freqüência (RF) (figura 2). Esta bobina possui sete espiras, e o cabo de RF é acoplado à parte central das espiras, ou seja, na terceira volta. O acoplamento na parte central é importante para que o plasma seja gerado adequadamente. Esse arranjo promove a geração de plasma quando se aplica um potencial RF. No ICP o sistema é caracterizado por ser tubular, e as amostras são posicionadas dentro do tubo, na região da bobina indutiva. O vácuo é gerado somente através de uma bomba mecânica, o que faz com que não se consiga atingir pressões muito baixas. A fim de reduzir o campo elétrico forma-se um escudo (“*shield*”) ao redor da bobina. A bobina sob a qual é colocado o indicador biológico é refrigerada para evitar seu aquecimento e conseqüente queima do cabo de rádio freqüência (RF), mantendo a temperatura constante durante todo o processo de esterilização. Após a redução da pressão, é injetado o gás de processo no interior do reator por meio de controladores de fluxo de massa.

Figura 1: Foto do equipamento ICP (*Inductively Coupled Plasma*)

Figura 2: Desenho esquemático do ICP (*Inductively Coupled Plasma*)

A manipulação do equipamento para os processos de esterilização exige várias fases, para obter a formação dos ciclos. Primeiramente é necessário fazer uma limpeza da câmara e avaliar as condições do equipamento, ou seja, se ele realmente está formando plasma. Para certificar a origem deste fenômeno é necessário observar a geração da energia luminosa, característica possível com o gás oxigênio puro (luminosidade branca) e com o peróxido de hidrogênio (luminosidade rosa).

Tais características são avaliadas através do pré-ciclo, que é semelhante aos ciclos reais do equipamento, as únicas diferenças constituem-se em ser realizado sem amostra na câmara e com tempo de exposição menor. Este processo é realizado anteriormente a todos os ciclos.

O funcionamento deste pré-ciclo ocorre conforme descrição a seguir: primeiramente é retirado quase todo o ar que existe dentro da câmara empregando bomba mecânica a vácuo (cerca de 90%), até atingir a pressão de 1mTorr, o que leva aproximadamente 1 minuto. Em seguida regula-se o fluxo do gás que vai utilizar (100sccm), e através desta etapa regula-se a pressão do processo através de uma válvula específica (330mTorr). Na seqüência é aplicada a potência utilizada e é formado o plasma, podendo-se observar os fótons de luz (luminosidade). Esta última etapa permanece num período de 6 minutos. A bomba mantém o vácuo, a circulação do gás e o seu bombeamento constantes.

Terminado o pré-ciclo, é desligado o fornecimento de RF, fechada a entrada de gás na câmara e aberta a válvula de controle de pressão (OHSHIMA et al., 1997). A pressão baixa até próximo a 1mTorr, sendo então fechada a válvula de controle. A bomba de vácuo também é desligada e injeta-se nitrogênio dentro da câmara. Depois de aproximadamente dois minutos a pressão sobe e a tampa da

câmara se abre, pois a bomba está desligada e o ambiente saturado de nitrogênio.

Após o pré-ciclo são realizados os ciclos reais com indicadores biológicos. O procedimento utilizado é o mesmo, com a diferença de que os ciclos têm tempos de exposição específicos, e a amostra (placa de Petri com lamínulas contendo os esporos bacterianos), posicionada inclinada e aberta num suporte de vidro dentro da câmara, para permitir contato direto com o plasma. No momento da abertura da porta da câmara, a placa é fechada e removida, com auxílio de pinça e luvas estéreis. O gás nitrogênio apresenta algumas vantagens quando satura a câmara: é um gás inerte e origina uma pressão positiva, impedindo a contaminação da amostra pelo ambiente externo.

Após a injeção dos gases o plasma é gerado por meio de um gerador de rádio frequência (RF) que, operando em 13,56 MHz, permite controlar a potência aplicada ao processo. Desta forma foram controlados tanto a geração de radicais no plasma, como o ataque iônico nas amostras (ISHISAKI, 1998).

Não existe um tempo longo de difusão do gás utilizado para a formação do plasma, pois a câmara do equipamento é pequena e a saturação do gás é rápida. Conforme a literatura o tempo de difusão pode chegar a 10 minutos, mas conforme testes realizados, com e sem tempo de saturação, os resultados obtidos mantiveram-se em ambas as situações.

Foram realizados alguns testes preliminares para observar melhor o funcionamento do equipamento, introduzindo assim algumas variáveis (Tabela 1).

Tabela 1: Testes desafios com indicadores biológicos (*Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372), sob variação de parâmetros para observação do comportamento do equipamento ICP (*Inductively Coupled Plasma*).

<i>Gás de Origem</i>	<i>Pressão (mmTorr)</i>	<i>Potências RF (Watts)</i>	<i>Vazão do Gás</i>	<i>Tempos Exposição</i>
Oxigênio	330mTorr	150W	100sccm	30, 40 min.
Oxigênio	330mTorr	200W	100sccm	30 min.
Oxigênio	330mTorr	250W	100sccm	30 min.
Oxigênio	330mTorr	300W	100sccm	30, 45 min.
Oxigênio	330mTorr	350W	100sccm	30, 45 min.
Oxigênio	330mTorr	400W	100sccm	15, 30 min.
Oxigênio	330mTorr	400W	200sccm	20 min.
Oxigênio	110mTorr	400W	40sccm	30 min.

O emprego de parâmetros abrangentes tornou possível estudar a efetividade do ICP, possibilitando a definição deste equipamento para emprego em processos esterilizantes.

Em continuidade foi estabelecida uma programação experimental com o ICP, seguindo para a tabela 2 com divisão de fases, em relação ao gás puro e a mistura de gases. A quantidade aproximada de indicadores biológicos utilizados nos ciclos foi de 790 unidades.

Tabela 2: Etapas (fases) da programação experimental dos desafios dos indicadores biológicos (*Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372), sob diferentes combinações de variáveis (ICP).

<i>FASES EXPERIMENTAIS</i>	<i>GÁS DE ORIGEM</i>	<i>PRESSAO (mTorr)</i>	<i>POTÊNCIAS RF (Watts)</i>	<i>VAZÃO DO GÁS (sccm)</i>	<i>TEMPOS EXPOSIÇÃO</i>	<i>TOTAL CICLOS</i>	<i>TOTAL IB's</i>
FASE I	O ₂ Puro	330	300, 350, 400	100	3 - 15' int.3' 20 - 60' int.20'	72	216
FASE II	O ₂ + H ₂ O ₂ (5,10,20%)	330	300, 350, 400	95 O ₂ + 5 H ₂ O ₂ 90 O ₂ + 10 H ₂ O ₂ 80 O ₂ + 20 H ₂ O ₂	3 - 15' int. 3' 20 - 40' int. 20'	189	567

LEGENDA: O₂ – Oxigênio; H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio; int. – Intervalos; IB – Indicadores Biológicos; RF – Rádio Frequência.

Apenas quando da obtenção de resultados evidenciando letalidade microbiana interessante foram efetuadas avaliações de microscopia eletrônica de varredura, como método de avaliação do mecanismo de letalidade.

4.2.5. Ciclos Laboratoriais de Exposição ao Gás Óxido de Etileno

As séries de exposições com o gás óxido de etileno foram realizadas com indicadores biológicos *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 , utilizando mistura esterilizante Oxyfume® 2002 (10% Óxido de Etileno, 63% HCFC 124 e 27% HCFC 22) e esterilizador da marca SERCON Ind. Com. Ap. Méd. Hosp. LTDA, modelo HETO 39/40 MP 3000, com controle automático e câmara horizontal cilíndrica de 76 litros de capacidade, 40 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade.

A umidade relativa de 40 a 60%, concentração de gás EtO de 450 mg/L (com pressão negativa de - 0,65 Kgf/cm² e pressão positiva de + 0,60 Kgf/cm²), temperatura de 55°C e tempos de exposição de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos, em triplicata, obtendo no total 15 ciclos, foram os parâmetros físicos utilizados durante o processo de esterilização.

Para cada ciclo foram empregados seis indicadores biológicos, sendo três para contagem de UFC e três reservados para eventual necessidade de reteste, assim como para avaliação sob microscopia eletrônica de varredura, perfazendo assim um total de 90 unidades. Os suportes com os microrganismos foram colocados na embalagem de Tyvec® para submissão aos processos de esterilização.

4.2.6. Contagem Microbiana

Primeiramente preparou-se o meio de cultura TSA (Tryptone Soya Agar - Oxoid®), e separou-se a quantidade de tubos de ensaio necessários, vórtex (MS1 Minishaker - IKA®), pinça, béquer, pipetador, ponteiras com suporte, placas de Petri, termômetro e cronômetro; o banho-maria (Fanem®) e a capela de fluxo vertical de ar (Veco®) também foram utilizados durante a análise e a autoclave (Luferco®) para esterilizar o material.

Para a análise de três placas de Petri, com três indicadores biológicos cada uma, separou-se um tubo de ensaio com 10 mL de água destilada estéril para cada lamínula no caso do plasma, e no EtO para cada disco de papel. Na primeira etapa adicionou-se, com uma pinça, cada suporte nos tubos de ensaio de 10 mL, devidamente identificados. Em seguida os tubos foram posicionados no

agitador orbital de tubos tipo vórtex na rotação de 3000 RPM, durante um minuto para plasma e por 20 minutos para o EtO, sendo que neste caso cada tubo de ensaio continha aproximadamente 20g de pérolas de vidro com dimensão de 5mm, para facilitar a liberação dos esporos.

Logo após submeteu-se os tubos, para ambos os casos, por quinze minutos em banho-maria a 70 °C, para a promoção do choque térmico. Efetuouse então as diluições decimais, para plaqueamento subsequente.

Para cada diluição (10^{-1} a 10^{-6}) foi utilizada a técnica de semeadura em profundidades “*Pour Plate*”, usando cerca de 15 mL de ágar caseína-soja estéril por placa. Após solidificação, foi adicionada superficialmente uma camada extra de 5 mL do mesmo meio de cultura estéril, de forma a originar um selo ou “*overlay*”, possibilitando a uniformização da disponibilidade de oxigênio às colônias bacterianas, e em decorrência da sua morfologia, otimizando a contagem. A incubação das placas foi na posição invertida em estufa a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, seguindo-se contagem do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) (UNITED..., 2002).

Todo o procedimento foi realizado com técnicas assépticas, em capela de fluxo laminar vertical de ar.

4.2.7. Acompanhamento da Letalidade e Resistência

Após o término de cada ciclo de exposição por óxido de etileno e após a aeração forçada e abertura do esterilizador, os indicadores biológicos foram transferidos para a área de aeração ambiental, permanecendo neste local por 24 horas (período padronizado).

Na esterilização por plasma, após a quebra do vácuo dentro da câmara utilizando nitrogênio puro, os indicadores biológicos provenientes dos ciclos foram armazenados a temperatura ambiente também por 24 horas.

Todos os dados obtidos das análises com o ICP e com o óxido de etileno foram analisados, permitindo a obtenção das curvas de letalidade e cálculo dos respectivos valores D (seqüência detalhada de valores e tempos), assim como análise estatística dos resultados.

Paralelamente foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da marca Philips e modelo SEM 515 (*“Scan Electronic Microscopic”*) para verificar variações na morfologia dos esporos, após os processos de esterilização, quando estes evidenciaram eficácia de resultados.

Para maior facilidade em acompanhar as etapas realizadas, apresenta-se na figura 3 o fluxograma das atividades desenvolvidas.

Figura 3: Fluxograma das atividades desenvolvidas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um método de esterilização tem por finalidade remover ou destruir todas as formas de vida, animal ou vegetal, macroscópicas ou microscópicas, saprófitas ou não, presentes no produto considerado. O procedimento selecionado, para atingir o nível de esterilização estabelecido, depende sobremaneira do material e das dificuldades impostas pela grande diversidade de produtos. O conhecimento do tipo da fonte e da carga inicial contaminante no produto, antes da esterilização, contribui para assegurar o êxito do processo (MARQUES, 2002).

Segundo Philips (1975), o objetivo do processo de esterilização é destruir qualquer forma de vida que possa comprometer o uso do produto durante seu esperado tempo de vida. A eficiência da esterilização depende não somente do próprio processo, mas também do pré e pós-tratamento dos produtos esterilizados. É importante saber o tipo, a origem e a quantidade de contaminantes para que a remoção seja eficiente. Esporos de bactérias são altamente resistentes, e portanto são usados nos indicadores biológicos para avaliar o nível de esterilização que se pode alcançar em diferentes processos.

Esporos de *Bacillus subtilis* foram estabelecidos como microrganismos de escolha para utilização neste trabalho, pois são largamente empregados como indicadores biológicos nos processos de esterilização, e apresentam várias vantagens: são altamente resistentes e possuem uma alta estabilidade no sistema de expressão; simplicidade e economia na produção de grandes quantidades destes esporos (ISTICATO et al., 2001); ausência de patogenicidade e fácil identificação, e histórico de emprego em trabalhos relacionados à esterilização com plasma.

Tortora et al. (2003), explica que as células de *Bacillus* que herdam certos genes formam cadeias organizadas. Após a divisão celular, a separação das células é iniciada, de modo que cada célula-filha permanece fixa no septo de divisão. A cadeia de células resultante se dobra e se retorce até que forma uma fibra helicoidal. Pesquisadores especulam que a estrutura dobrada é mais organizada que uma cadeia em movimento, e assim mais estável.

Segundo Park et al. (2003), esterilização consiste em processo físico ou químico que destrói ou elimina microrganismos, ou ambos. Métodos tradicionais de esterilização incluem autoclave (calor úmido), estufa (calor seco), químico como EtO, e radiação (raios gama), os quais são seguros e conhecidos. No entanto, todos estes métodos têm suas vantagens e desvantagens. O método de calor úmido não pode ser utilizado para materiais com fácil fusão, como os polímeros. O EtO é altamente tóxico, e pode ser absorvido em plásticos. Durante a irradiação o material pode sofrer alterações indesejáveis. Por estas razões, um método mais rápido e menos perigoso de esterilização para variados materiais faz-se necessário. Um novo método de esterilização quanto à proteção e conservação de materiais é o tratamento por plasma.

O processo de esterilização por plasma é um método inovador e que apresenta vantagens em relação aos outros métodos de esterilização já existentes.

Adicionalmente, sabe-se de limitações possíveis quanto aos aspectos de validação do processo esterilizante por plasma, seja no que tange a limitações dimensionais da câmara esterilizante, seja na configuração do produto. Encontram-se como causas destas preocupações a distribuição não homogênea de plasma formado, assim como a meia vida de suas entidades sabidamente instáveis (MOISAN et al., 2001).

O ICP (*Inductively Coupled Plasma*) é composto de um tubo de quartzo horizontal, circundado por uma bobina de rádio-freqüência (RF). Esse arranjo promove a geração de plasma quando se aplica um potencial RF aos terminais desta bobina. A amostra fica posicionada sobre a bobina.

Para maior segurança na confiabilidade dos resultados, posicionou-se o indicador biológico (placa de Petri com triplicata de lamínulas na concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/suporte) em posição inclinada dentro do tubo (câmara horizontal), sobre um suporte de vidro, onde o Plasma formado é arrastado em direção ao contato direto com a amostra.

No processo de esterilização por plasma, os indicadores biológicos foram inoculados em lamínulas de vidro, porque em estudos realizados comprovou-se que amostras de discos de papel submetidos por 10 minutos a tratamento por plasma mostraram substancial degradação da celulose (MOREIRA et al., 2004).

Antes de seguir uma programação experimental no decorrer do trabalho foram realizados alguns testes aleatórios para melhor conhecer o equipamento empregado. Este não era utilizado anteriormente como equipamento de esterilização por plasma, e sendo esta linha de estudo inovadora, sentiu-se esta necessidade.

Nestes testes, potências e concentrações de gases diferentes foram utilizadas em tempos de exposições maiores, objetivando melhor definição dos parâmetros para a programação experimental. As elevadas potências utilizadas foram decorrentes de características inerentes à bomba do equipamento empregado.

Em todos os testes realizados neste trabalho, tanto os aleatórios, quanto os da programação experimental, foram realizadas triplicatas de ciclos, objetivando obter reprodutibilidade de resultados para cada conjunto de parâmetros. Os

parâmetros e resultados obtidos após os testes aleatórios realizados neste equipamento estão apresentados a seguir no Quadro 1.

Quadro 1: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC com o emprego do ICP sob distintas condições.

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão do gás: 100sccm</p> <p>Potência: 150 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
30	$2,66 \times 10^5$	5,42
40	$1,01 \times 10^5$	5,00

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão da gás: 100sccm</p> <p>Potência: 200 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
30	$1,52 \times 10^5$	5,18

Continuação do Quadro 1: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC com o emprego do ICP sob distintas condições.

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão do gás: 100sccm</p> <p>Potência: 250 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
30	$1,7 \times 10^4$	4,23

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão do gás: 100sccm</p> <p>Potência: 300 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
30	$4,5 \times 10^3$	3,65
45	$3,33 \times 10^1$	1,52

Continuação do Quadro 1: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC com o emprego do ICP sob distintas condições.

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão do gás: 100sccm</p> <p>Potência: 350 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
30	$9,4 \times 10^2$	2,97
45	<10 UFC/lamínula	n.d.

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão do gás: 100sccm</p> <p>Potência: 400 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
15	$9,5 \times 10^3$	3,97
30	75	1,87

Continuação do Quadro 1: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC com o emprego do ICP sob distintas condições.

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 330mTorr</p> <p>Vazão do gás: 200sccm</p> <p>Potência: 400 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
20	8×10^3	3,90

<p>ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)</p> <p>OXIGÊNIO PURO</p> <p>Pressão: 110mTorr</p> <p>Vazão do gás: 40sccm</p> <p>Potência: 400 W</p>		
Tempo de Exposição (minutos)	N° de Sobreviventes	Log
30	10	1,00

Foi possível observar a evolução dos resultados no decorrer das análises com os testes aleatórios, e desta maneira conhecer melhor o comportamento do equipamento, particularmente com as mudanças de potências. Com 150W em 30 e 40 minutos houve uma queda logarítmica; com 200W para 250W em 30 minutos acentuou-se a redução da carga microbiana; de 300W para 350W em 30 e 45 minutos houve um resultado interessante, onde carga microbiana diminuiu significativamente (Quadro 1). Na tentativa seguinte, com 400W em 30 minutos o equipamento não resistiu, devido à potência muito alta, tendo como consequência a queima do cabo de RF, sendo que neste processo o ICP permitiu um ciclo de 15 minutos, então abortado, e que consistiu em resultado também satisfatório (Quadro 1).

Uma adaptação foi realizada no ICP com refrigeração a ar nos locais (capacitores e conectores) que apresentaram problemas de aquecimento, então novamente a tentativa do processo de 400W em 30 minutos foi testada, permitindo resultados adequados (Quadro 1). Permaneceu, entretanto, situação de aquecimento excessivo nesta potência, levando a reflexão quanto a introdução de sistema de refrigeração mais eficiente. Nos parâmetros de 400W e mudando a vazão para 200sccm e tempo de 20 minutos e ainda a vazão para 40sccm e pressão para 110mTorr em 30 minutos, pôde-se observar resultados que evidenciam queda acentuada na carga microbiana (Quadro 1).

Com os parâmetros dos resultados dos testes aleatórios, elaborou-se uma programação experimental, onde se considerou duas fases, a primeira apenas utilizando o gás oxigênio (100sccm) e a segunda utilizando a mistura do oxigênio com o peróxido de hidrogênio, este nas concentrações de 5, 10 e 20% sendo as potências para ambas as fases de 300, 350 e 400W.

Quadro 2: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e gás oxigênio.

1ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO PURO Pressão: 330mTorr Vazão: 100sccm Potência: 300 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$3,43 \times 10^6$	6,53
6	$1,38 \times 10^6$	6,14
9	$1,67 \times 10^5$	5,22
12	$3,98 \times 10^4$	4,60
15	$5,21 \times 10^3$	3,71
20	$2,69 \times 10^3$	3,43
40	6,63	0,82
60	<10UFC/lamínula	n.d.

Quadro 3: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e gás oxigênio.

1ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO PURO Pressão: 330mTorr Vazão: 100sccm Potência: 350 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$3,47 \times 10^5$	5,54
6	$1,58 \times 10^5$	5,20
9	$5,80 \times 10^3$	3,76
12	$3,22 \times 10^3$	3,50
15	$2,70 \times 10^2$	2,43
20	<10UFC/lamínula	n.d.
40	<10UFC/lamínula	n.d.
60	<10UFC/lamínula	n.d.

Quadro 4: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e gás oxigênio.

1ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO PURO Pressão: 330mTorr Vazão: 100sccm Potência: 400 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$4,20 \times 10^5$	5,62
6	$1,02 \times 10^5$	5,01
9	$1,34 \times 10^5$	5,12
12	$2,62 \times 10^3$	3,41
15	$2,07 \times 10^2$	2,31
20	< 10UFC/lamínula	n.d.
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 5: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 5% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Pressão: 330mTorr Vazão: 95sccm de O₂ e 5sccm de H₂O₂ Potência: 300 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,41 \times 10^6$	6,14
6	$5,47 \times 10^5$	5,73
9	$1,16 \times 10^5$	5,06
12	$3,32 \times 10^4$	4,52
15	$1,76 \times 10^4$	4,24
20	$1,94 \times 10^2$	2,28
40	< 10UFC/lamínula	n.d.

Quadro 6: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 5% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Pressão: 330mTorr Vazão: 95sccm de O₂ e 5sccm de H₂O₂ Potência: 350 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,24 \times 10^6$	6,09
6	$4,14 \times 10^5$	5,61
9	$8,07 \times 10^4$	4,90
12	$1,23 \times 10^4$	4,09
15	$7,15 \times 10^3$	3,85
20	$1,51 \times 10^2$	2,18
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 7: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 5% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Pressão: 330mTorr Vazão: 95sccm de O₂ e 5sccm de H₂O₂ Potência: 400 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	N° de sobreviventes	Log
3	$8,42 \times 10^5$	5,92
6	$2,47 \times 10^5$	5,39
9	$7,06 \times 10^4$	4,84
12	$4,27 \times 10^3$	3,63
15	$1,92 \times 10^3$	3,28
20	$1,22 \times 10^1$	1,08
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 8: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 10% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase		
ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)		
OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO		
Pressão: 330mTorr		
Vazão: 90sccm de O ₂ e 10sccm de H ₂ O ₂		
Potência: 300 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,60 \times 10^6$	6,20
6	$5,68 \times 10^5$	5,75
9	$2,22 \times 10^5$	5,34
12	$8,30 \times 10^4$	4,91
15	$2,43 \times 10^4$	4,38
20	$1,78 \times 10^3$	3,25
40	$1,10 \times 10^1$	1,04

Quadro 9: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 10% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase		
ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)		
OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO		
Pressão: 330mTorr		
Vazão: 90sccm de O ₂ e 10sccm de H ₂ O ₂		
Potência: 350 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,48 \times 10^6$	6,17
6	$4,66 \times 10^5$	5,66
9	$1,20 \times 10^5$	5,08
12	$5,08 \times 10^4$	4,70
15	$1,11 \times 10^4$	4,04
20	$1,55 \times 10^3$	3,19
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 10: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 10% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Pressão: 330mTorr Vazão: 90sccm de O₂ e 10sccm de H₂O₂ Potência: 400 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,07 \times 10^6$	6,03
6	$3,76 \times 10^5$	5,57
9	$8,13 \times 10^4$	4,91
12	$8,60 \times 10^3$	3,93
15	$7,14 \times 10^3$	3,85
20	$2,40 \times 10^4$	4,38
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 11: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 300 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 20% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase		
ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)		
OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO		
Pressão: 330mTorr		
Vazão: 80sccm de O ₂ e 20sccm de H ₂ O ₂		
Potência: 300 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,74 \times 10^6$	6,24
6	$1,16 \times 10^6$	6,06
9	$2,68 \times 10^5$	5,42
12	$2,32 \times 10^5$	5,36
15	$7,38 \times 10^4$	4,86
20	$2,00 \times 10^4$	4,30
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 12: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 350 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 20% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Pressão: 330mTorr Vazão: 80sccm de O₂ e 20sccm de H₂O₂ Potência: 350 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,58 \times 10^6$	6,19
6	$1,13 \times 10^6$	6,05
9	$1,59 \times 10^5$	5,20
12	$6,49 \times 10^4$	4,81
15	$2,09 \times 10^4$	4,32
20	$9,19 \times 10^3$	3,96
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Quadro 13: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do plasma através do ICP (*Inductively Coupled Plasma*) sob potência de 400 Watts em diferentes tempos e com mistura de gases (vazão do gás: 20% de peróxido de hidrogênio).

2ª fase ICP (<i>Inductively Coupled Plasma</i>) OXIGÊNIO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO Pressão: 330mTorr Vazão: 80sccm de O₂ e 20sccm de H₂O₂ Potência: 400 Watts		
Tempo de exposição (minutos)	Nº de sobreviventes	Log
3	$1,27 \times 10^6$	6,10
6	$8,09 \times 10^5$	5,90
9	$1,53 \times 10^5$	5,18
12	$1,89 \times 10^4$	4,27
15	$1,49 \times 10^4$	4,17
20	$1,72 \times 10^3$	3,23
40	< 10 UFC/lamínula	n.d.

Nos resultados obtidos nos ciclos efetuados com o gás oxigênio puro, primeira fase, foi possível observar uma queda logarítmica acentuada, levando até a ausência de detecção de microrganismos sobreviventes.

Segundo Hury et al. (1998), na esterilização de plasma de oxigênio, a degradação dos microrganismos é ativada pela sua própria lenta combustão com os átomos de oxigênio e/ou radicais presentes no plasma, sendo que, em temperaturas mais elevadas, esta combustão produz CO_2 e H_2O .

No processo com a potência de 300 Watts, o número de microrganismos sobreviventes já estava bastante reduzido no tempo de 40 minutos e quando chegou ao período de 60 minutos não se detectou microrganismos sobreviventes(Quadro 2).

Pode-se observar que no trabalho com esterilização por plasma de acoplamento indutivo de Gans et al. (2004) também utilizou-se potência de 300W e concentrações de esporos com indicadores biológicos de 10^6 a 10^7 UFC.

Nos processos com as potências de 350 e 400 Watts, no tempo de 15 minutos já houve um decaimento significativo da carga microbiana e ao final do período de 20 minutos, não mais foram detectados microrganismos sobreviventes (Quadro 3 e 4). No período de 6 e 9 minutos para a potência de 400W houve um elevação de resultados maior do que para a potência de 350W, mas com diferença reduzida, sendo que nos demais tempos, para a potência de 400W, os resultados foram mais promissores (Quadro 4).

Para cada condição de processo foi construída a curva de letalidade e obtido o respectivo valor D. Este valor representa o tempo de exposição necessário para alteração em um fator de 10, ou redução de 90% da população microbiana, ou ainda o tempo necessário para reduzir um ciclo logarítmico na curva de sobreviventes (PINTO et al., 2003).

Figura 4: Curva de letalidade do processo com o gás oxigênio puro (primeira fase) na potência de 300W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 100sccm, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20, 40 e 60 minutos, com Valor D.

Figura 5: Curva de letalidade do processo com o gás oxigênio puro (primeira fase) na potência de 350W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 100sccm, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minutos, com Valor D.

Figura 6: Curva de letalidade do processo com o gás oxigênio puro (primeira fase) na potência de 400W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 100sccm, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minutos, com Valor D.

Figura 7: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 300W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 95 sccm para oxigênio e 5 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 8: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 350W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 95 sccm para oxigênio e 5 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 9: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 400W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 95 sccm para oxigênio e 5 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 10: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 300W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 90 sccm para oxigênio e 10 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 11: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 350W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 90 sccm para oxigênio e 10 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 12: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 400W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 90 sccm para oxigênio e 10 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 13: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 300W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 80 sccm para oxigênio e 20 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 14: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 350W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 80 sccm para oxigênio e 20 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Figura 15: Curva de letalidade do processo com a mistura dos gases (segunda fase) na potência de 400W, pressão 330 mTorr, vazão de gás 80 sccm para oxigênio e 20 sccm para peróxido de hidrogênio, em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 15, 20 e 40 minutos, com Valor D.

Observando as curvas de letalidade dos três ciclos de processos do oxigênio puro, o valor D da menor potência 300W é maior do que com 350W, por sua vez maior do que 400W. Não houve porém diferença significativa em relação aos valores D das maiores potências, que foram respectivamente para 350 e 400W, 3,08 e 3,04 minutos, diferentemente dos ciclos de 300W em que o valor D foi de 8,27 minutos (Figura 4, 5 e 6).

Nas análises realizadas com a mistura de gases, foi possível observar que quanto menor a concentração da vazão do gás peróxido de hidrogênio, menor é a carga microbiana após o desafio (maior efetividade do processo), sendo que nos tempos de 40 minutos para todas as concentrações e potências a contagem logarítmica foi baixa, portanto satisfatória (Quadros 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Nos processos com concentração de 5% de peróxido de hidrogênio a contagem microbiana foi menor que com 10 e 20%, com valores de redução logarítmica próximos. Nas potências maiores o valor D foi menor, mas não caracterizou diferença significativa, já que considerando as diferentes concentrações e potências os valores D variaram num intervalo entre 5 e próximo de 7 minutos (Quadros 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

O peróxido de hidrogênio como gás precursor de formação de plasma, não apresentou bons resultados, sendo que quanto maior a concentração deste gás, maior resultou a contagem microbiana dos sobreviventes, e os valores D apresentaram-se maiores. Embora o peróxido de hidrogênio seja tipicamente um gás que tem eficácia, pelo seu poder bactericida, nos experimentos os resultados obtidos com o oxigênio puro foram melhores que com a mistura de gases. Os parâmetros utilizados e resultados obtidos foram inovadores, porém os resultados da mistura de

gases não foram reavaliados, ou seja, não foram realizados processos adicionais para investigar os diferentes resultados obtidos.

Vickery et al. (1999) utilizou em seu trabalho o sistema de esterilização Sterrad®, e neste equipamento o peróxido de hidrogênio realmente é muito eficaz, pois ele é o ativo principal, sendo seu tempo de difusão 50 minutos depois da injeção do volume de 18 mL deste gás a 59%, seguido de 15 minutos de plasma a 400 Watts. Neste caso não foi o plasma de peróxido de hidrogênio responsável pela morte microbiana e sim a atividade intrínseca do gás precursor.

Portanto, no tratamento com Sterrad®, a fase química é evidenciada como maior responsável pela eficácia bactericida. Esta fase também é responsável por algumas pequenas alterações químicas nos materiais. Na verdade o H_2O_2 pode induzir oxidação do polímero, e o vapor do gás pode apresentar penetração variável em produtos médicos, em plásticos distintos tais como PVC e PE, com a espessura de 1mm (LEROUGE et al.).

No decorrer dos processos de esterilização por plasma de acoplamento indutivo, pôde-se presumir que a temperatura do processo permaneceu próxima da temperatura ambiente, como era esperado. A medição da temperatura não foi realizada com sucesso, pois o termômetro adaptado na tampa do equipamento sofreu contato direto com as radiações eletromagnéticas na formação do plasma, registrando assim temperatura acima da real. Entretanto, as amostras retiradas do equipamento evidenciaram temperatura próxima da ambiente e não apresentaram sinais de aquecimento excessivo.

Park et al. (2003) também, nos seus estudos com esterilização por plasma, sofreram dificuldades em relação a altas temperaturas no processo. No equipamento que utilizaram, nos tempos de 1, 5, 10, e 30 segundos foram medidas

temperaturas de 75 a 130° C, sendo que o efeito da alta temperatura não foi investigado, tendo em vista ter sido assumido que o calor gerado pelo gás plasma consistia em calor seco. Geralmente, com calor seco leva-se cerca de 120, 60, e 30 minutos a 160, 170, e 180° C respectivamente para se atingir ação esterilizante, portanto altas temperaturas e longos tempos.

Nas figuras a seguir, é possível observar as fotos dos indicadores biológicos em suportes laminulares (placa de Petri) (Fig. 16), e dentro da câmara de esterilização (tubo de quartzo) (Fig. 17). Seguem figuras evidenciando, sob fotomicrografias empregando SEM, esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 antes da exposição ao plasma e após, nas potências dos processos de 300, 350 e 400W (melhores resultados em tempos maiores).

Figura 16: Indicadores biológicos constituídos por *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 inoculados em laminulas de vidro de dimensões 18x18mm.

Figura 17: Tubo de quartzo da câmara de sistema plasma por acoplamento indutivo.

Figura 18: Esporo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 isolado antes da exposição ao processo esterilizante empregando plasma.

Figura 19: Colônia de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 não submetida ao desafio com plasma.

Figura 20: Esporo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, empregando plasma, com potência de 300W e período de 60 minutos (destruição da parede celular).

Figura 21: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 350W e período de 40 minutos.

Figura 22: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 400W e período de 20 minutos.

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (figuras 18 a 22) permitem constatar a destruição das paredes celulares dos microrganismos no decorrer dos processos, nos melhores períodos de exposição através do mecanismo de ação do plasma por ataque iônico. A carga microbiana quando não evidenciada através da técnica de contagem utilizada nestes experimentos, é considerada $<10\text{UFC/lamínula}$ e traduz-se na não viabilidade celular ou total perda da capacidade reprodutiva.

Park et al. (2003) também utilizam em seu trabalho com esterilização por Plasma o indicador biológico *Bacillus subtilis* e empregando o SEM, fotografam algumas amostras após os processos, também demonstrando nitidamente o dano e a ruptura das membranas das células.

De forma semelhante, considerando o plasma obtido a partir de mistura de gases (oxigênio e peróxido de hidrogênio), pode-se observar efeito de agressão celular mais intenso proporcionalmente ao aumento dos tempos de exposição. Também são apresentadas situações de proporções distintas dos gases.

Assim realizou-se uma análise estatística dos resultados obtidos no ICP, que estudaram as variações de parâmetros em proporções de diferentes gases e potências.

Primeiramente calcularam-se as médias e desvios padrão de D para cada potência e tipo de gás (tabela 3), ou seja, tanto para oxigênio puro quanto para a mistura de gases (300, 350 e 400W) e em seguida calculou-se as médias de valor D e desvio padrão somente para cada tipo de gás (tabela 4).

Cada média na tabela a seguir fornece um determinado valor D, onde este é equivalente a um resultado obtido de uma triplicata de análises realizadas para

aquela determinada potência e concentração de gás, pois em todos os casos realizou-se triplicata de processos para cada intervalo de tempo.

Tabela 3: Valores utilizados para análise estatística do plasma:

Repetição	%H ₂ O ₂	Potência (W)	D (minutos)
1	Oxigênio puro	300	8.1900
2	Oxigênio puro	300	8.4890
3	Oxigênio puro	300	8.2713
1	Oxigênio puro	350	3.1726
2	Oxigênio puro	350	2.7716
3	Oxigênio puro	350	3.0950
1	Oxigênio puro	400	3.0479
2	Oxigênio puro	400	3.0845
3	Oxigênio puro	400	2.9682
1	5	300	5.6850
2	5	300	5.6625
3	5	300	5.6529
1	10	300	6.5876
2	10	300	7.3099
3	10	300	5.7307
1	20	300	5.9844
2	20	300	5.7937
3	20	300	5.9524
1	5	350	5.3050
2	5	350	5.4795
3	5	350	5.7307
1	10	350	5.7339
2	10	350	5.8685
3	10	350	5.8411
1	20	350	5.9701
2	20	350	5.9067
3	20	350	5.6786
1	5	400	5.5772
2	5	400	5.6370
3	5	400	5.5279
1	10	400	6.1805
2	10	400	6.2578
3	10	400	6.1996
1	20	400	5.7703
2	20	400	5.8207
3	20	400	5.8893

Tabela 4: Médias e desvios padrão de D por tipo de gás (%H₂O₂).

%H ₂ O ₂	n	Média de D	Desvio padrão de D
oxigênio puro	9	4.788	2.650
5	9	5.584	0.131
10	9	6.190	0.508
20	9	5.863	0.104

n: tamanho da amostra

A figura a seguir demonstra os dados da tabela 4, obtendo uma comparação de valores D entre os gases, e para todas as potências.

Figura 23: Médias de D por % de H₂O₂ (para todas as potências) (dados da Tabela 4).

Elaborou-se separadamente para cada potência, independente do tipo de gás e sua concentração, uma tabela de médias de desvios padrão e valores D (tabela 5), onde é possível observar os resultados obtidos para cada potência.

Tabela 5. Médias e desvios padrão de D por potência.

Potência (W)	n	Média de D	Desvio padrão de D
300	12	6.6091	1.1366
350	12	5.0461	1.2428
400	12	5.1634	1.3065

n: tamanho da amostra

Figura 24: Médias de D por potência (para todos os tipos de gás) (dados da Tabela 5).

Na figura 24 é importante observar que independente do tipo de gás utilizado e da sua concentração, no ICP apenas as maiores potências conduziram a valores D menores.

Para o oxigênio puro, onde os resultados foram mais promissores nas maiores potências, elaborou-se uma figura (figura 25), onde se observa cada valor D separadamente para cada potência.

Figura 25: Médias de D para cada potência. Oxigênio puro.

Para O₂ puro ajustou-se uma curva, cuja equação é:

$$D = 0,0011\text{Potência}^2 - 0,7983 \times \text{Potência} + 151,97$$

R^2 é o coeficiente de determinação, varia entre 0 e 1, e indica que porcentagem da variação total dos dados é explicada pela curva de ajuste. Quanto mais próximo ele está de 1, melhor é o ajuste dos dados feito por essa curva. Neste caso o ajuste é perfeito, a curva passa pelos 3 pontos ($R^2=1$), mas tem-se apenas 3 pontos, o ideal seria ter um número maior de pontos para conhecer melhor o comportamento de D à medida que aumenta a potência.

A tabela a seguir (tabela 6) demonstra as médias de valores D e o seu desvio padrão, para cada potência e concentração de gás, sendo este valor referente ao total de amostras, ou seja, das triplicatas.

Tabela 6. Médias e desvios padrão de D por %H₂O₂ e potência.

%H ₂ O ₂	Potência (W)	N	Média de D	Desvio padrão de D
0 (O ₂ puro)	300	3	8.317	0.1546
0 (O ₂ puro)	350	3	3.013	0.2127
0 (O ₂ puro)	400	3	3.034	0.0594
5	300	3	5.667	0.0165
10	300	3	6.543	0.7906
20	300	3	5.910	0.1021
5	350	3	5.505	0.2140
10	350	3	5.815	0.0711
20	350	3	5.852	0.1533
5	400	3	5.581	0.0546
10	400	3	6.213	0.0403
20	400	3	5.827	0.0597

n: tamanho da amostra

Na figura 26 e 27 observam-se todos os resultados obtidos no decorrer das análises do ICP, tanto para oxigênio puro quanto para a mistura de gases, evidenciando os valores individuais de cada triplicata (dados da tabela 3).

Figura 26: Valores individuais de D para cada combinação de $\%H_2O_2$ (gás) e potência.

Figura 27: Intervalos de 95% de confiança das médias de D para cada combinação de potência e $\%H_2O_2$.

Nas figuras a seguir (figuras 28 e 29) observam-se as médias dos valores D para cada potência e tipo de gás, oxigênio puro e mistura de gases, com peróxido de hidrogênio nas concentrações de 5, 10 e 20% (tabela 6).

Figura 28: Médias de D para cada potência e %H₂O₂ (1).

Figura 29: Médias de D para cada potência e %H₂O₂ (2).

Realizou-se uma análise de variância (General Linear Model) para verificar se existe interação gás x potência, e diferenças de D entre as potências e %H₂O₂.

Tabela 7: Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível significância (p)
%H ₂ O ₂	3	9,6926	3,2309	49,02	0,000
Potência	2	18,1873	9,0937	137,98	0,000
%H ₂ O ₂ xpotência	6	38,7030	6,4505	97,87	0,000**
Erro	24	1,5818	0,0659		
Total	35	68,1646			

** Existe interação Potência x %H₂O₂, ou seja, as linhas das Figuras 27 e 28 não são paralelas: o comportamento de D é diferente para as distintas potências à medida que aumenta a porcentagem de H₂O₂.

Para cada potência foi feita uma análise de variância de um fator (%H₂O₂) para verificar a existência de diferenças de D entre as %H₂O₂.

300W:

Figura 30: Médias (em azul) e valores individuais (em vermelho) de D por %H₂O₂, 300W.

Para 300 Watts foi feita uma análise de variância (tabela 8) de um fator (%H₂O₂) para verificar possíveis diferenças de D entre os tipos de gás.

Tabela 8: Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D, 300 Watts.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível significância (p)
%H ₂ O ₂	3	12,891	4,297	26,06	0,000**
Erro	8	1,319	0,165		
Total	11	14,210			

** : existem diferenças significantes de D entre %H₂O₂.

Para verificar entre que tipos de gás há diferenças foi calculado o teste de Tukey cujos resultados aparecem a seguir.

Tabela 9: Intervalos de confiança de Tukey, 300 Watts.

Comparação das %H ₂ O ₂	Limite inferior	Centro	Limite superior
0 e 5%	-3,7120	-2,6500	-1,5879
0 e 10%	-2,8361	-1,7740	-0,7120
0 e 20%	-3,4686	-2,4066	-1,3446
5 e 10%	-0,1861	0,8759	1,9380
5 e 20%	-0,8187	0,2434	1,3054
10 e 20%	-1,6946	-0,6326	0,4295

Obs: O Centro é a diferença das médias das duas %H₂O₂.

Quando o intervalo não contém o zero, existem diferenças significantes das médias (de D) para esses dois tipos de gás; quando contém o zero, não existem diferenças significantes das médias de D.

Para 300W observou-se que existem diferenças de D entre O₂ puro e 5%, O₂ puro e 10%, e entre O₂ puro e 20%: para O₂ puro D é maior que para as três porcentagens de H₂O₂, como podemos ver na Figura 30 da página anterior.

350W

Figura 31: Médias de D por %H₂O₂, 350W.

Para 350W foi feita uma análise de variância de um fator (%H₂O₂.) para verificar possíveis diferenças de D entre as %H₂O₂..

Tabela 10: Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D, 350 Watts.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível significância (p)
%H ₂ O ₂	3	16,7504	5,5835	186,75	0,000**
Erro	8	0,2392	0,0299		
Total	11	16,9896			

** : existem diferenças significantes de D entre %H₂O₂.

Para verificar entre que %H₂O₂ há diferenças foi calculado o teste de Tukey cujos resultados aparecem a seguir.

Tabela 11: Intervalos de confiança de Tukey, 350W.

Comparação das %H ₂ O ₂	Limite inferior	Centro	Limite superior
0 e 5%	2,0398	2,4920	2,9442
0 e 10%	2,3492	2,8014	3,2537
0 e 20%	2,3865	2,8387	3,2910
5 e 10%	-0,1428	0,3094	0,7617
5 e 20%	-0,1055	0,3467	0,7990
10 e 20%	-0,4149	0,0373	0,4895

Obs: O Centro é a diferença das médias das duas %H₂O₂.

Quando o intervalo não contém o zero, existem diferenças significantes das médias (de D) para essas duas %H₂O₂; quando contém o zero, não existem diferenças significantes das médias de D.

Para 350W observou-se que existem diferenças de D entre O₂ puro e 5%, O₂ puro e 10%, e entre O₂ puro e 20%: para O₂ puro D é menor que para as outras três %, como podemos ver na Figura 31.

400W

Figura 32: Médias de D por %H₂O₂. 400W

Para 400W foi feita uma análise de variância de um fator (%H₂O₂) para verificar possíveis diferenças de D entre as %H₂O₂.

Tabela 12: Resultados da Análise de variância (General Linear Model) para D, 400W.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível significância (p)
%H ₂ O ₂	3	18,75425	6,25142	2135,38	0,000**
Erro	8	0,02342	0,00293		
Total	11	18,77767			

** : existem diferenças significantes de D entre %H₂O₂.

Para verificar entre que %H₂O₂ há diferenças foi calculado o teste de Tukey cujos resultados aparecem a seguir.

Tabela 13: Intervalos de confiança de Tukey, 400W.

Comparação das %H ₂ O ₂	Limite inferior	Centro	Limite superior
0 e 5%	2,4057	2,5472	2,6887
0 e 10%	3,0376	3,1791	3,3206
0 e 20%	2,6517	2,7932	2,9347
5 e 10%	0,4904	0,6319	0,7734
5 e 20%	0,1046	0,2461	0,3876
10 e 20%	-0,5274	-0,3859	-0,2444

Obs: O Centro é a diferença das médias das duas %H₂O₂. Quando o intervalo não contém o zero, existem diferenças significantes das médias (de D) para essas duas %H₂O₂; quando contém o zero, não existem diferenças significantes das médias de D.

Para 400W observou-se que existem diferenças de D entre todas as %H₂O₂ (isto é devido à pequena variabilidade apresentada, ver os desvios padrão para 400W da Tabela 6). Observando a Figura 32 das médias de D, observou-se que para O₂ puro o valor de D foi inferior que para as outras %H₂O₂.

No decorrer do trabalho o software utilizado para a realização de toda a análise estatística foi o Minitab 14.

Para ter uma melhor visualização dos processos realizados, nas figuras a seguir, observam-se algumas fotos dos microrganismos em SEM, após os processos com plasma na mistura de gases e potências dos processos (300, 350 e 400W):

Figura 33: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 300W e período de 40 minutos em 90sccm de oxigênio e 10sccm de peróxido de hidrogênio.

Figura 34: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 350W e período de 40 minutos em 90sccm de oxigênio e 10sccm de peróxido de hidrogênio.

Figura 35: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 400W e período de 40 minutos em 95sccm de oxigênio e 5sccm de peróxido de hidrogênio.

Figura 36: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo, com potência de 400W e período de 20 minutos em 80scm de oxigênio e 20scm de peróxido de hidrogênio.

Nos dois casos, tanto com o oxigênio puro quanto a mistura de gases, pôde-se observar que algumas fotos estão com dimensões diferentes. Aquelas com aumento menor permitem observar a concentração de microrganismos presentes naquela determinada região, observando assim em grupo, o nível de destruição total dos microrganismos (visão de conjunto). Com o aumento maior, é possível observar a morfologia, detalhes da erosão e topografia dos microrganismos e o nível de degradação da membrana devido ao ataque iônico do plasma.

Pode-se observar nas fotos anteriores que em alguns processos ainda há a formação de esporos onde a parede celular não está destruída, tendo ocorrido realmente um determinado crescimento microbiano, por exemplo nas figuras 33 (log 1,04) e 36 (log 3,23). Já em algumas fotos é possível observar a destruição de todos microrganismos presentes naquela região, principalmente nos processos realizados com potências maiores, pois quanto maior a potência utilizada, maior o

ataque iônico e conseqüentemente melhor o resultado em relação à esterilização (figura 21, 22, 34 e 35).

Nas figuras 18 e 19 pôde-se observar nitidamente a estrutura da parede celular dos microrganismos antes de passarem pelo processo de esterilização.

Os processos de esterilização por óxido de etileno foram realizados para se obter uma análise comparativa com os processos de esterilização por plasma.

O EtO é sabidamente efetivo na destruição de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. As propriedades microbicidas do EtO são resultados da reação de alquilação. Testes foram realizados em intervalos de tempos para observar o comportamento do EtO e seu respectivo valor D. Os resultados obtidos evidenciaram diferença significativa com relação ao valor D apresentado pela esterilização por plasma. Esta comparação é interessante, pois o EtO é um método de esterilização largamente empregado e de reconhecida eficácia.

No quadro e na figura a seguir é possível observar os resultados obtidos com o EtO:

Quadro 14: Número de sobreviventes a partir de indicadores biológicos contendo 10^7 UFC evidenciando resultados com o emprego do processo de esterilização por Óxido de Etileno em diferentes tempos.

Óxido de Etileno - 450 mg/L		
Tempo de Exposição (minutos)	Nº de Sobreviventes	Log (UFC/suporte)
3	$1,79 \times 10^2$	2,25
6	$5,00 \times 10^1$	1,69
9	$4,70 \times 10^1$	1,67
12	$2,90 \times 10^1$	1,46
15	1	n.d.

Figura 37: Curva de letalidade do processo por esterilização com óxido de etileno em intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos, com Valor D.

Pode-se observar um interessante resultado nos processos de esterilização por EtO, obtendo-se valor D de 2,80 minutos (Figura 37).

Nas figuras a seguir, é possível observar fotos dos indicadores biológicos em suportes (disco de papel), empregando SEM, antes e após os desafios com EtO, nos parâmetros definidos na metodologia (melhor resultado no tempo de 15 minutos):

Figura 38: Colônia de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 não submetida ao desafio com EtO.

Figura 39: Esporo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 antes de submetido ao desafio com EtO.

Figura 40: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo por EtO no período de 15 minutos (disco de papel).

Figura 41: Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 após desafio do processo por EtO no período de 15 minutos (disco de papel).

Nas fotos por SEM, pode-se observar que as estruturas celulares dos esporos submetidos aos desafios com EtO continuam intactas (figuras 40 e 41). Isto ocorre porque o EtO é um poderoso agente alquilante e exerce efeito letal nos microrganismos por alquilação de proteínas, DNA e RNA, não afetando a estrutura externa dos esporos (PINTO et al., 2003).

Nas figuras anteriores também é possível observar os esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 entre as fibras de celulose (figuras 38, 39, 40 e 41), sendo que o processo por EtO não age apenas na superfície do suporte e possui grande absorção, por isso apresenta efeito letal.

Objetivando facilitar a visualização do conjunto de desafios e resultados obtidos no presente trabalho, foi elaborado um quadro com os valores D de todas as situações, tanto empregando plasma (oxigênio puro e mistura de gases) quanto EtO (Quadro 15).

Quadro 15: Comparação dos valores D obtidos durante todo o trabalho:

Resultados dos Valores D		
Oxigênio Puro		
300W	350W	400W
8,27	3,08	3,04
Mistura de gases		
300W/ 5%	350/ 5%	400W/5%
5,65	5,69	5,56
300W 10%	350W/10%	400W/10%
6,77	5,83	6,20
300W/20%	350W/20%	400W/20%
5,94	5,89	5,82
Óxido de Etileno (450mg/L)		
2,80		

Verificam-se grandes variações de resultados de valores D. Observou-se tanto valores mais altos quanto mais baixos, e não houve uma diferença significativa entre alguns valores D do plasma com do EtO.

Realizou-se assim uma análise estatística, mas objetivando agora trabalhar com os melhores resultados do plasma ICP, ou seja, os que se aproximaram dos resultados obtidos pelo EtO, portanto considerando os processos de 350 e 400 W com o gás oxigênio puro (maiores potências).

Na tabela a seguir observam-se valores D das repetições de cada triplicata de cada potência (300 e 400W) no processo por plasma com oxigênio puro, onde se obteve os melhores resultados com a triplicata do EtO.

Tabela 14: Valores utilizados para análise estatística do EtO e plasma:

Repetição	Processos	Potência (W)	D
1	Oxigênio puro	350	3.1726
2	Oxigênio puro	350	2.7716
3	Oxigênio puro	350	3.0950
1	Oxigênio puro	400	3.0479
2	Oxigênio puro	400	3.0845
3	Oxigênio puro	400	2.9682
1	Oxido Etileno	-	2.7855
2	Oxido Etileno	-	2.7465
3	Oxido Etileno	-	2.9291

Na tabela a seguir observam-se as médias dos valores D das triplicatas com seus respectivos desvio padrão.

Tabela 15: Médias e desvios padrão de D para O₂ puro: 350 e 400 Watts e Óxido de Etileno.

%H₂O₂	Potência (W)	N	Média de D	Desvio padrão de D
0 (O ₂ puro)	350	3	3,013	0,2127
0 (O ₂ puro)	400	3	3,034	0,0594
Oxido Etileno	-	3	2,8204	0,0962

Realizou-se uma análise de variância de um fator (grupo) para verificar se existem diferenças significantes do D, entre os grupos: O₂ puro 350 watts, O₂ puro 400 watts e EtO; e não foram encontradas diferenças significantes ($p>0,05$). Os dados encontram-se na tabela 16, a seguir.

Tabela 16: Resultados da Análise de variância de um fator:

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível significância (p)
Grupo	2	0,0830	0,0415	2,15	0,198 NS
Erro	6	0,1160	0,0193		
Total	8	0,1990			

NS: não significante.

Na figura seguinte (figura 42) observa-se a média de valores D por grupo e individual para cada item analisado: esterilização por plasma de oxigênio puro em potências de 350 e 400W e esterilização por EtO. Na figura 43 observa-se o Box plot de valor D por grupo.

Figura 42: Médias (em azul) e valores individuais (em vermelho) de D por grupo, para os grupos: O₂ puro 350W, O₂ puro 400W e Óxido de Etileno.

Figura 43: Box Plot de D por grupo, para os grupos: O₂ puro 300W, O₂ puro 400W e Óxido de Etileno.

A base do retângulo é o valor mínimo de D para esse grupo, a linha superior do retângulo é o valor máximo de D para esse grupo, a linha horizontal dentro do retângulo é a mediana de D para esse grupo, o círculo é a média do grupo.

Analisando todos os dados obtidos com estes grupos observa-se que os valores D para esterilização com plasma para potências de 350 e 400W (oxigênio puro) e esterilização por EtO são próximos.

Dentre os processos de esterilização mais utilizados atualmente, foi elaborada uma tabela que agrega valores D citados em diferentes fontes bibliográficas, para distintos processos esterilizantes, sendo possível visualizar os diferentes parâmetros necessários para cada processo, e assim também observar que o plasma pode ser uma alternativa inovadora, principalmente pelas suas vantagens: não gera risco de toxicidade ocupacional e aos pacientes, trabalha em temperatura próxima ao ambiente, fácil manipulação e direcionado especialmente para material odontológico-hospitalar (incluindo os termossensíveis). Para efeito comparativo,

dispõe-se na tabela 17 informações de literatura quanto a Valores D, indicadores biológicos, temperatura de processo e mecanismo de ação para distintos processos esterilizantes. Tais informações podem ressaltar a importância dos resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 17: Comparação entre processos de esterilização mais utilizados atualmente:

Método de Esterilização	Valor D	Indicador Biológico	T °C de processo	Mecanismo de Ação
Plasma	3,04 min	<i>Bacillus subtilis</i>	próxima á T °C ambiente	Erosão química/ UV
Óxido de Etileno (EtO)	2,8 min	<i>Bacillus subtilis</i>	55 °C	Alquilação
Autoclave (calor úmido)	1,5 min ¹	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ¹	121 °C ²	Desnaturação das proteínas ²
Estufa (calor seco)	62-110 min ³	<i>Bacillus subtilis</i> ³	170 °C ²	Oxidação ²
Plasma de Peróxido de Hidrogênio	3,0 - 4,0 ⁴ min	<i>Bacillus subtilis</i> ⁴	42 à 50 °C ⁴	Oxidação pelo agente ativo ⁴
Radiação	1,6 - 4,5 kGy ⁵	<i>Bacillus pumilus</i> ⁵	próxima á T °C ambiente ⁵	Dupla quebra nas fitas do DNA impedindo a regeneração ⁶ e bloqueando a replicação ⁶

1 - MANN A., KIEFER M., LEUENBERGER H. Thermal sterilization of Heat-Sensitive products using high-temperature short-time sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Switzerland, Vol. 90, p. 285-287, 2001.

2 - TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 6.ed. São Paulo: Artmed, 2003. p.182-190.

3 – FOX K., PFLUG I.J. Effect of temperature and gas velocity on the dry-heat destruction rate of bacterial spores. **Applied Microbiology**, USA, Vol. 16, p.343-348, Feb 1968.

4 - KREBS, M.C., BÉCASSE, P. VERJAT, D. DARBORD, J. C. Gas Plasma Sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase . **Inteernational Journal of Pharmaceutics** 160, p. 75-81, 1998.

5 – ITO, H. MD ISLAM, S. Effect of dose rate in inactivation of microorganisms in spices by electro-beams and gamma-rays irradiation. **Radiat. Phys. Chem.** Great Britain, Vol. 43, N° 6, p. 545-550, 1994.

6 - PINTO, T.J.A.; KANETO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêutico, correlatos e cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.122,123

6. CONCLUSÕES

1. O equipamento de esterilização por plasma de acoplamento indutivo (ICP) apresentou resultados promissores e interessantes.
2. O gás oxigênio puro apresentou melhores resultados do que a mistura de gases oxigênio e peróxido de hidrogênio.
3. O plasma formado, através do contato com a superfície das amostras, indicadores biológicos, com carga inicial padronizada, apresentou atividade bactericida.
4. Os processos que apresentaram melhores resultados foram os de 350 Watts, pois a carga microbiana diminuiu rapidamente e seu valor D foi o segundo mais baixo, 3,08 minutos. Nestes processos o aquecimento do equipamento foi discreto.
5. Nos processos de 400 Watts pôde-se observar um elevado aquecimento no equipamento, principalmente em períodos de ciclos mais longos, sendo seu valor D igual a 3,04, com pouca diferença frente ao processo de 350 Watts.
6. Os processos de esterilização por plasma apresentaram valores D aproximados ao do EtO, nos melhores parâmetros 350W e 400W (oxigênio puro), sendo estes 3,08 min e 3,04 min respectivamente e do EtO foi de 2,80 min. A diferença entre estes valores não é significativa, principalmente pelas vantagens que o plasma oferece frente ao óxido de etileno, pela sua baixa toxicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N. Bacterial ability of ethylene oxide plus 90% hydrochlorofluorocarbon sterilizing gas. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.18, n.9, p.641-645, 1997.

- AMERICAN INTERNATIONAL STANDARDS INSTITUTE; ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. **Biological Indicators for ethylene oxide sterilization processes in health care facilities**. Arlington, 1986. p.1-8. (ANSI/AAMI ST, 21/1986).

- AMERICAN INTERNATIONAL STANDARDS INSTITUTE; ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. **Guideline for industrial ethylene oxide sterilization of medical devices**: process design, validation, routine sterilization and contract sterilization. Arlington, 1988. p.1-20. (ANSI/AAMI ST, 27/1988).

- ANDERSON, M.N. Gas plasma sterilization: innovation in practice. **Navy Medicine**, v.80, n.5, p.9-10, 1989.

- ATKINS, P.; PAULA, J. **Atkins' physical chemistry**. 7.ed. Oxford, New York: Oxford University Press, 2002. 485p.

- BACKGROUND INFORMATION. **Plasma sterilization**: a limited infection control technique. S.l.: s.n., 1996. v.4. (Reference Book).

- BARD INTERNATIONAL. **100% ethylene oxide information, CFC reduction, options to CFC. economic comparison**. Murray Hill, 1990. 32p. [Information Bulletin].

- BIER, O. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene**. 18.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1977. 843p.
- BOLT, H.M. Quantification of endogenous carcinogens. **Biochemical Pharmacology**, v.52, p.1–5, 1996.
- BRADFORD, T.; COOK, M.N. **Inductively coupled plasma**. S.l.: s.n., 1997. Disponível em: <http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/smprimer/icp/icp.html>. Acesso em: 23/abril/05.
- BROWN, W.H. **Introduction to organic chemistry**. 2.ed. Fort Worth, London: Saunders College, 2000. p.224-225. (Saunders Golden Sunburst Series).
- BRUICE, P.Y. **Organic chemistry**. 2.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998. p.446–1142.
- BRYCE, E.A.; CHIA, E.; LOGELIN, G.; SMITH, J. An evaluation of the AbTox Plazlyte sterilization system. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.18, n.9, p.646–653, 1997.
- BURGESS, D.J.; REICH, R.R. Industrial ethylene oxide sterilization. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology**: a practical guide for manufactures and users of health care products. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. cap.7, p.152-195.
- CHAPMAN, B.N. **Glow discharge processes**: sputtering and plasma etching. New York, Chichester: Wiley-Interscience, 1980. p.49-50.

- CHAU, T.T.; KAO, K.C.; BLANK, G.; MADRID, F. Microwave plasmas for low – temperature dry sterilization. **Biomaterials**, v.17, n.13, p.1273–1277, 1996.

- COBURN, J.W. **Plasma etching and reactive ion etching**. New York: American Institute of Physics, 1982. p.1-87. (American Vacuum Society Monograph Series).

- D'AGOSTINO, R. **Plasma deposition, treatment and etching of polymers**. Boston, London: Academic, 1990. 528p. (Plasma – materials interactions).

- FERRAZ, C.A.M. **Otimização da esterilização industrial de artigos médico-hospitalares, por óxido de etileno, utilizando-se *Bacillus subtilis* como indicador biológico**. São Paulo, 1997. 154p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- FOX, K.; PFLUG, I.J. Effect of temperature and gas velocity on the dry-heat destruction rate of bacterial spores. **Applied Microbiology**, v.16, n.2, p.343-348, 1968.

- GADRI, R.B.; ROTH, J.R.; MONTIE, T.C.; WINTENBERG, K.K.; TSAI, P.P.-Y.; HELFRITCH, D.J.; FELDMAN, P.; SHERMAN, D.M.; KARAKAYA, F.; CHEN, Z. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). **Surface & Coatings Technology**, v.131, p.528-542, 2000.

- GANESAN, A.T.; HOCH, J.A., eds. **Bacillus molecular genetics and biotechnology applications**. Orlando: Academic Press, 1986. p.73-84, 111-113, 231-238. (Papers of the 3rd. International Conference on the Genetics and Biotechnology of Bacilli).

- GANS, T.; OSIAC, M.; O'CONNELL, D.; KADETOV, V.A.; CZARNETZKI, U.; SCHWARZ-SELINGER, T.; HALFMANN, H.; AWAKOWICZ, P.

Characterization of stationary and pulsed inductively coupled RF discharges for plasma sterilization. **Plasma Physics and Controlled Fusion**, v.47, A353-A360, 2005.

- HAYAKAWA, I.; FURUKAWA, S.; MIDZUNAGA, A.; HORIUCHI, H.; NAKASHIMA, T.; FUJIO, Y.; YANO, Y.; ISHIKURA, T.; SASAKI, K. Mechanism of inactivation of heat – tolerant spores of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12250 by rapid decompression. **Journal of Food Sciences**, v.63, n.3, p.371-374, 1998.
- HELMELIN, I.J.; BURTIN, C.; LEVERGE, R.; PRUGNAUD, J.L. Côté de fonctionnement de deux systèmes de stérilisation à basse température, centralisé et décentralisé. **Journal de Pharmacie Clinique**, v.17, n.3, p.138–144, 1998.
- OKPARA-HOFMANN, J.; KNOLL, M.; DÜRR, M.; SCHMITT, B.; LIPP, M.B. Comparison of low-temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization for endoscopes using various Sterrad™ models. **Journal of Hospital Infection**, v.59, n.4, p.280-285, 2005.
- HURY, S.; VIDAL, D.R.; DESOR, F.; PELLETIER, J.; LAGARDE, T. A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.417-421, 1998.
- ISHISAKI, E.T. **Validação da autoclave na esterilização de solução parenteral**. São Paulo, 1998. 129p. Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, T.T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D.; OGGIONI, M.R.; FELICE, M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface display of

recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.21, p.6294-6301, 2001.

- ITO, H.; ISLAM, S. Effect of dose rate in inactivation of microorganisms in spices by electro-beams and gamma-rays irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.43, n.6, p.545-550, 1994.
- JACOBS, P.T. **Sterrad sterilization system**: a new technology for instruments sterilization. S.I.: Advanced Sterilization Products, a division of Johnson & Johnson Medical, 1994. 32p. [Comunicação Interna].
- KREBS, M.C.; BÉCASSE, P.; VERJAT, D.; DARBORD, J.C. Gas plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. **International Journal of Pharmaceutics**, v.160, p.75-81, 1998.
- KUCHMA, T.N.; SAMOILENKO, I.I.; ALIPOV, Y.E, LYSTSOV, V.N. Study of the mechanisms of the combined action of microwave electromagnetic radiation and hydrogen peroxide on the viability of micro-organisms. **Biophysics**, v.41, n.2, p.427-434, 1996.
- LEROUGE, S.; GUIGNOT, C.; TABRIZIAN, M.; FRRIER, D.; YAGOUBI, N.; YAHIA, L.H. Plasma-based sterilization: effect on surface and bulk properties and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p.774-782, 2000.
- LEROUGE, S.; WERTHEIMER, M.R.; MARCHAND, R.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.'H. Effect of gas composition on spore mortality and etching during low – pressure plasma sterilization. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.51, n.1, p.129-135, 2000.

- MANN, A.; KIEFER, M.; LEUENBERGER, H. Thermal sterilization of heat-sensitive products using high-temperature short-time sterilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, p.285-287, 2001.

- MARQUES, M. **Determinação dos parâmetros cinéticos de destruição térmica de *Bacillus subtilis* ATCC 9372 e *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 em soluções parenterais**. São Paulo, 2002. 170p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MORTEAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.H. Low – temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.226, p.1-21, 2001.

- MONTASER, A., ed. **Inductively coupled plasma mass spectrometry**. New York: John Wiley, 1998. p.1-29.

- MOORE, G.L. **Introduction to inductively coupled plasma: atomic emission spectrometry**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. v.3, p.65-89, 265-283. (Analytical spectroscopy library, v.3).

- MOREIRA, A.J.; MANSANO, R.D.; PINTO, T.J.A.; RUAS, R.; ZAMBON, L.S.; SILVA, M.V.; VERDONK, P.B. Sterilization by oxygen plasma. **Applied Surface Science**, v.235, p.151-155, 2004.

- MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A. **Técnicas de laboratório**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p.181-187.

- MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C., eds. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p.239-242, 349-350, 352-353, 1298, 1315.
- OHSHIMA, T.; SATO, K.; TERAUCHI, H.; SATO, M. Physical and chemical modifications of high – voltage pulse sterilization. **Journal of Electrostatics**, v.42, n.1/2, p.159-166, 1997.
- OLIVEIRA, D.C. **Esterilização por óxido de etileno**: estudo da efetividade esterilizante de misturas não explosivas e compatíveis com a camada de ozônio. São Paulo, 2000. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- PARK, B.J.; LEE, D.H.; PARK, J.C. Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure. **Physics of Plasmas**, v.10, n.11, p.4539-4544, 2003.
- PHILIPS, G.B. Sterilization. In: REMINGTON'S Pharmaceutics Sciences. 15.ed. Easton: Mack, 1975.
- PINTO, T.J.A.; KANETO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêutico, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.110-125.
- RESSINETI, N.A. **Determinação de nutrientes minerais em alguns alimentos por ICP – AES**. São Paulo, 1998. 131p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of**

desinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell Scientific, 1982. 653p.

- RUTALA, W.A.; GERGEN, M.F.; WEBER, D.J. Sporicidal activity of a new low – temperature sterilization technology: the sterrad 50 sterilizer. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.20, n.7, p.514-516, 1999.
- RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Low – temperature sterilization technologies: do we need to redefine ‘sterilization’? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.17, n.2, p.87-91, 1996.
- SHINTANI, H. The relative safety of gamma-ray, autoclave and ethylene oxide gas sterilization of the thermosetting polyurethane. **Biomedical Instrumentation & Technology**, v.29, n.6, p.513-519, 1995.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.89, 182-190.
- UMAM, M.A. **Introduction to plasma physics**. New York: McGraw-Hill, 1964. p.1-7.
- UNITED States Pharmacopeia: 25.ed., The National Formulary: NF21. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.200-206, 1846-1849, 1976-1981.
- VICKERY, K.; DEVA, A.K.; ZOU, J.; KUMARADEVA, P.; BISSET, L. COSSART, Y.E. Inactivation of duck hepatitis B virus by a hydrogen peroxide gas plasma sterilization system: laboratory and “in use” testing. **Journal of Hospital Infection**, v.41, p.317-322, 1999.