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

Esterilização por Óxido de Etileno: Estudo da Efetividade Esterilizante de Misturas Não Explosivas e Compatíveis com a Camada de Ozônio

Débora Cristina de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2000

Débora Cristina de Oliveira

Esterilização por Óxido de Etileno: Estudo da Efetividade Esterilizante de Misturas Não Explosivas e Compatíveis com a Camada de Ozônio

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Profª Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Presidente e Orientadora

Profª Drª. Dominique Corine Hermine Fisher
Primeira Examinadora

Profª Drª. Célia Hitomi Yamamoto
Segunda Examinadora

São Paulo,10 de abril de 2000

Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.
Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, mas não vai embora sozinha e nem nos deixa só, pois leva um pouco de nós e deixa um pouco de si.
Há as que levam muito e há as que deixam pouco. Há as que deixam muito e há as que levam pouco.
Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as almas não se encontram por acaso.

Charlie Chaplin

DEDICO

Aos meus pais, Alicio e Maria Zilda, fontes de sabedoria e acolhimento, exemplos de vida e luta, em reconhecimento do privilégio de ser sua filha;

Aos meus irmãos Siumara e Alicio Jr, grandes amigos de todas as jornadas;

A minha orientadora Profa Tit. Terezinha J. A. Pinto, por ter me ensinado a dar os primeiros passos no caminho da pesquisa, pelo conhecimento sabiamente transmitido, pelo carinho, respeito, e acima de tudo, amizade;

A Deus, presente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro, essencial para a execução e conclusão do presente trabalho.

À Coordenadoria do Curso de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade no desenvolvimento do presente trabalho.

À WHITE MARTINS, na pessoa dos Srs. Cláudio Borges Bonato e Gustavo H.J.A. Pinto, pelo valioso apoio na execução da parte experimental do presente trabalho.

À SERCON, na pessoa dos Srs. Joel A. de Lima, Nilson Corrêa da Silva e demais técnicos, pelos diversos auxílios referentes a manutenção de equipamento e instalações da Central de Esterilização por Óxido de Etileno do FBF-FCF USP.

À ELI LILLY do BRASIL, na pessoa do Sr. Cláudio Sombini pelos incentivos quanto ao meu desenvolvimento profissional.

Às professoras Mitsuko T. Ohara e Telma M. Kaneko, pelas sugestões e contribuições ao desenvolvimento do trabalho

À Mónica Inés Casajus, pela ajuda e execução do delineamento estatístico utilizado no presente trabalho.

Aos amigos do laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, em especial ao José, Márcio e Patrícia pela amizade e contribuições essenciais durante toda execução do presente trabalho.

Aos amigos Catherine, Lilian e Fernando Zaia pela amizade e especial incentivo durante a árdua etapa final do presente trabalho.

À amiga Maria Djair, pelo carinho, amizade, compreensão e constante incentivo na busca pela vitória.

Ao amigo Alexandre, pelo especial companheirismo durante nossa trajetória de Pós-Graduandos.

Ao amigo Luís A. B. Leoni, meu primeiro incentivador.

À bibliotecária Adriana Barreiros pela revisão feita nas referências bibliográficas.

À todas estas pessoas, inclusive àquelas que não foram nominadas, expresso aqui a minha profunda gratidão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **3**

2.1. PROCESSOS ESTERILIZANTES 3
2.2. ESTERILIZAÇÃO POR ÓXIDO DE ETILENO 8
2.2.1. Introdução 8
2.2.2. Âmbito de Aplicação 9
2.2.3. Residual no Produto 12
2.2.4. Resíduo Ambiental: Aspectos de Engenharia e Ocupacional 18
2.2.5. Aspectos de Toxicidade 22
2.3. ÓXIDO DE ETILENO E DILUENTES 30
2.3.1. Introdução 30
2.3.2. Ação biológica de diluentes 32
2.3.3. Importância e Riscos à Camada de Ozônio 35
2.4. CONTROLE DO PROCESSO ESTERILIZANTE POR ÓXIDO DE ETILENO 51
2.4.1. Introdução 51
2.4.2. Indicadores e Monitores Biológicos 52
2.4.3. Validação do processo 59

3. OBJETIVO **60**

4. MATERIAL E MÉTODO **61**

4.1. MATERIAL 61
4.2. MÉTODO 62
4.2.1. Preparação de suspensões de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 62
Repiques de Manutenção 62
Obtenção de Esporos 63
Acompanhamento do Grau de Esporulação 64
Recolhimento e lavagem dos esporos 64
Tratamento térmico 65
4.2.2. Padronização da suspensão de esporos 65
4.2.3. Preparação e inóculo dos suportes celulósicos 66
4.2.4. Contagem confirmatória da carga microbiana inoculada 67
Método de desintegração em liquidificador 68
Método de desintegração em agitador vortex 68
4.2.5. Ciclos laboratoriais de exposição ao gases esterilizantes 70
4.2.6. Acompanhamento de letalidade e resistência 71
4.2.7. Determinação do nível residual de óxido de etileno no ambiente 71
4.2.8. Análise Estatística 72

5. RESULTADO E DISCUSSÃO **73**

6. CONCLUSÃO 137

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 138

8. RESUMO 156

9. SUMMARY 158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L,45 ^{0}C. 112

Figura 2. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 45^{0}C. 112

Figura 3. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposicões com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 45^{0}C. 113

Figura 4. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 45^{0}C. 113

Figura 5. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 55^{0}C. 114

Figura 6. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 55^{0}C. 114

Figura 7. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposicões com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 55^{0}C. 115

Figura 8. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 55^{0}C. 115

Figura 9. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 65^{0}C. 116

Figura 10. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 65^{0}C. 116

Figura 11. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposicões com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 65^{0}C. 117

Figura 12. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 65^{0}C. 117

Figura 13. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 45^{0}C. 118

Figura 14. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 45^{0}C. 118

Figura 15. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 45^{0}C. 119

Figura 16. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 45^{0}C. 119

Figura 17. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 55^{0}C. 120

Figura 18. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 55^{0}C. 120

Figura 19. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 55^{0}C. 121

Figura 20. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 55^{0}C. 121

Figura 21. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 65^{0}C. 122

Figura 22. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 65^{0}C. 122

Figura 23. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 65^{0}C. 123

Figura 24. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 65^{0}C. 123

Figura 25. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e concentração de gás (600mg/L e 450mg/L), à temperatura de 45^{0}C.... 125

Figura 26. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e concentração de gás (600mg/L e 450mg/L), à temperatura de 55^{0}C.... 125

Figura 27. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e concentração de gás (600mg/L e 450mg/L), à temperatura de 65^{0}C.... 126

Figura 28. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), à temperatura de 45^{0}C. 127

Figura 29. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), à temperatura de 55^{0}C. 127

Figura 30. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), à temperatura de 65^{0}C.. 128

Figura 31. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e origem dos monitores (laboratorial e comercial), à temperatura de 45^{0}C.130

Figura 32. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e origem dos monitores (laboratorial e comercial), à temperatura de 55^{0}C.130

Figura 33. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e origem dos monitores (laboratorial e comercial), à temperatura de 65^{0}C.131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos I. 78

Tabela 2. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos II. 79

Tabela 3. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos III. 80

Tabela 4. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos IV. 81

Tabela 5. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos V. 82

Tabela 6. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos VI. 83

Tabela 7. Resultado da contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, em UFC/mL, obtido dos frascos 1, 2 e 3 e representativos para o "pool" de esporos. 85

Tabela 8. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, veiculados pelos suportes inoculados, após desintegração em liquidificador, Copo 1. 86

Tabela 9. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, veiculados pelos suportes inoculados, após desintegração em liquidificador, Copo 2. 87

Tabela 10. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, veiculados pelos suportes celulósicos em disco inoculados, após desintegração em tubos de ensaio sob agitação em vortex. 89

Tabela 11. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 dos monitores biológicos Attest^{R} (cód. 1264) da 3M, veiculados em suportes celulósicos retangulares após desintegração em tubos de ensaio sob agitação em vortex. 91

Tabela 12. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^{R} em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 93

Tabela 13. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^{R} em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 93

Tabela 14. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^{R} em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 94

Tabela 15. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^{R} em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 94

Tabela 16. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^{R} em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 95

Tabela 17. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^{R} em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 95

Tabela 18. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^{R} em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 96

Tabela 19. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^{R} em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 96

Tabela 20. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^{R} em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 97

Tabela 21. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^{R} em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 97

Tabela 22. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^{R} em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 98

Tabela 23. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-

letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 98

Tabela 24. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 99

Tabela 25. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 99

Tabela 26. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 100

Tabela 27. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 100

Tabela 28. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 101

Tabela 29. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 101

Tabela 30. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 102

Tabela 31. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 102

Tabela 32. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 103

Tabela 33. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. 103

Tabela 34. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em

1. INTRODUÇÃO

A constante evolução da ciência médica tem possibilitado o desenvolvimento de novas tecnologias, terapias, procedimentos e instrumentais, levando a acelerado crescimento na diversidade e quantidade de artigos médico-hospitalares, nos quais torna-se imperativo o atendimento às características de efetividade e segurança, esta última diretamente relacionada à esterilidade.

A introdução de materiais termolábeis na fabricação destes provocou o aparecimento de novos métodos esterilizantes compatíveis que utilizam temperaturas relativamente baixas, principalmente processos químicos gasosos, dentre os quais o óxido de etileno ocupou rapidamente o primeiro lugar (23).

O processo de esterilização por óxido de etileno apresenta diversas variáveis a serem controladas, tornando-se fundamental o uso de monitores biológicos como instrumentos de controle. Estes permitem a interação dos diferentes parâmetros e traduzem diretamente a efetividade do ciclo esterilizante em termos da letalidade dos microrganismos que veiculam.

As características desejáveis apresentadas pelo óxido de etileno incluem alta difusibilidade e permeabilidade, o que possibilita esterilização de materiais contidos em embalagens seladas, bem como acesso ao interior de materiais de lúmem longo e estreito; entretando, devido a características de flamabilidade e explosividade, o uso de misturas com dióxido de carbono ou hidrocarbonetos fluorados tornou-se muito difundido.

Os compostos clorofluorcarbonos (CFCs) apresentam determinadas características que os elegem adequados para uso na indústria de refrigeração,

propelentes para aerosóis, produção de polímeros e em menor escala, componentes de misturas esterilizantes. O CFC 12 tem sido o ingrediente inerte de misturas mais utilizado para esterilização a nível industrial e hospitalar. Entretanto, seu emprego tem sido reconsiderado devido ao seu alto poder de depleção da camada do ozônio (106), o que impulsionou diversas pesquisas na busca por compostos menos reativos com o ozônio, porém mantendo aspectos de compatibilidade e eficácia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Processos Esterilizantes

Desde os primórdios do conhecimento científico da microbiologia já se associava a existência de microrganismos com a instalação de infecções, sendo que a nível hospitalar, estas estavam geralmente associadas ao uso de medicamentos, equipamentos e instrumentais. Em meados do século XIX, constatou-se num primeiro momento que a eliminação dos microrganismos seria fundamental para possibilitar o uso seguro de artigos médico-hospitalares. Assim sendo, surgiu o conceito do que viria a ser chamado de processo de esterilização como sendo recurso utilizado na destruição de microrganismos presentes nesses instrumentais e equipamentos (60).

Conceitualmente, um método de esterilização tem por finalidade remover ou destruir todas as formas de vida microscópicas, saprófitas ou não, presentes no produto considerado e com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de armazenagem e utilização do mesmo. Entretanto, seria incorreto afirmar que para métodos destrutivos ocorre a morte de todos os microrganismos. 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, visam minimizar essa possibilidade, na tentativa de atingir o "sterility assurance level" (SAL), ou nível de segurança de esterilidade pré-definido (34,135).

Assim, o procedimento esterilizante selecionado para atingir o nível de segurança de esterilidade estabelecido para determinado produto dependerá

principalmente da natureza desse produto e da carga microbiana inicial presente no mesmo (34).

Dentre os métodos esterilizantes disponíveis, o 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 ítens resistentes ao calor e à umidade. O mecanismo de injúria celular consiste em coagulação e denaturação irreversível de proteínas e enzimas celulares, sendo que o tempo necessário para atingir o nível de esterilidade no geral proposto é reduzido, da ordem de 15 a 20 minutos. A condição de pressão adotada promove rápido aumento de temperatura, importante para a morte microbiana (109).

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. A morte microbiana se dá através da oxidação de constituintes celulares, e o processo é recomendado para materiais que possam ser danificados pelo calor úmido ou que não permitam 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 elevadas e tempos via de regra extensos. As condições no geral empregadas são da ordem de 170^{0}C por 60 minutos, 160^{0}C por 120 minutos e 150^{0}C por 150 minutos (109).

Há entretanto uma importante fração de produtos termolábeis, os quais são totalmente incompatíveis com ambos os processos térmicos. A uma parte destes ítens é possível que se aplique a esterilização por irradiação. Tomando de forma ampla este tipo de processamento, mais explorada tem sido a radiação ionizante, a qual compreende os raios X, alfa, beta, gama, prótons, nêutrons e elétrons, que promovem efeitos diretos e indiretos, estes

decorrentes da reação de estruturas celulares com íons carregados. São também utilizados os raios não ionizantes ultra-violeta, que encontram emprego limitado devido ao seu baixo poder de penetrabilidade. Ao contrário, as radiações ionizantes possuem alto poder de penetrabilidade, razão pela qual os locais de trabalho são revestidos com paredes de concreto de, no mínimo, 2,5m de espessura e revestidos com chumbo e vidro. Os raios gama são os mais utilizados, geralmente emitidos por isótopos radioativos ^{60}Co, ^{137}Ce e ^{182}Ta, podendo se considerar ainda, de forma promissora, os aceleradores de elétrons. Dentre as aplicações 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 (107).

Particularmente no caso de muitos dos materiais 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 (114).

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. Embora possíveis de aplicação em equipamentos automatizados e com controle dos parâmetros fundamentais à eficácia do processo, citando tanto o formaldeído quanto o óxido de etileno, este último conseguiu uma quase universalidade de uso em relação ao primeiro. Apesar dos avanços, permanecem para o segundo questionamentos quanto à ciclos não efetivos, embora atendendo às especificações operacionais.

Aliado às características de elevada difusibilidade e volatilidade, que respondem pela eficácia e segurança biológica do processo esterilizante por óxido de etileno, a facilidade com que sempre se contornou suas características negativas (flamabilidade, com a adoção de misturas inertes ou em plantas planejadas para conferir a necessária segurança; toxicidade, com o emprego de equipamentos de proteção individual-EPIs, e coletiva-EPCs), tornou este o processo esterilizante de maior opção, particularmente dentre os fabricantes de artigos médico-hospitalares.

O processo caracteriza-se por uma 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 (20). Dentre os métodos de esterilização industrial, o mais eficiente é o de MC DONALD (83), o qual consiste de uma sequência de etapas que se inicia com a elevação da temperatura até valores próximos de 45°C. Segue-se o vácuo na câmara da ordem de 27 polegadas de Hg, o que propicia condições ótimas de umidificação e aquecimento. Para a umidificação, o vapor é introduzido à câmara em vácuo, de modo a atingir 45 a 85% de umidade relativa. Procede-se então à introdução da mistura gasosa sob pressão e concentração pré-determinadas. O tempo de exposição pode variar, dependendo do tipo de embalagem, densidade e volume da carga microbiana, e se o esterilizador possui circulação de gás. No final do ciclo, procede-se à redução da pressão e eliminação dos gases através de lavagens consecutivas com ar filtrado ou gás inerte, devendo ser feita tendo em mente a proteção dos operadores e manutenção de baixos resíduos nos produtos.

Tendo em vista a intenção de abranger os diferentes processos esterilizantes, não se pode omitir o processo esterilizante por filtração, que difere conceitualmente dos demais por não envolver cinética de morte microbiana. Consiste em método de remoção mecânica de microrganismos

presentes em líquidos, com ênfase para os termolábeis, utilizando-se membranas esterilizantes de tamanho de poro da ordem de 0,22 a 0,45 micrômetros, constituídos no geral de ésteres de celulose ou outros materiais poliméricos. Todo o material auxiliar empregado é previamente esterilizado, sendo ainda imprescindíveis condições de assepsia durante o processo, assim como controles, incluindo a verificação da integridade do sistema filtrante, além de desafios com suspensão microbiana de *Brevundimonas diminuta* (34, 60, 107).

Também no reprocessamento de materiais médico-hospitalares, aspecto que se constitui em grande preocupação nos hospitais, o óxido de etileno tem sido o esterilizante de escolha. Entretanto, a frequente 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^{R}), plasma de ácido peracético (AbTox^{R}) e vapor de peróxido de hidrogênio. Entretanto, as novas tecnologias apresentam aplicações limitadas, devendo-se proceder ao seu emprego com conhecimento quanto às vantagens e restrições. Conceitualmente, aplicam-se a situações específicas no âmbito hospitalar, não extrapoláveis à indústria (109).

2.2. Esterilização por Óxido de Etileno

2.2.1. Introdução

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. Apresentam ação bactericida, esporicida, virucida e fungicida, agindo por alquilação não específica de radicais químicos como hidroxila (OH), amina (NH_2) e sulfidrila (SH), com perda do H e formação de grupo alquil-hidroxila (20, 43, 103, 107). Esses radicais encontram-se presentes em vários componentes celulares como ácidos nucléicos, 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 consequentemente, injúria ou morte celular (20).

O óxido de etileno pode se comportar como gás à temperatura ambiente, ou líquido a temperaturas abaixo de seu ponto de ebulição. Seus vapores apresentam características de flamabilidade e explosividade (20, 21, 38, 39, 125) quando em contato com pequena quantidade de ar da ordem de 3% e na presença de certos catalizadores (íons Cu^{+2}, Ag^{+2} e Mg^{+2}). Em razão dessas características, é frequentemente misturado com outros gases inertes a fim de alcançar misturas esterilizantes não inflamáveis, assim como não explosivas (63).

Dentre os gases frequentemente usados como diluentes encontram-se o clorofluorcarbono 12 (CFC 12), dióxido de carbono (CO_2) (20) e, mais recentemente, hidroclorofluorcarbonos 22 e 124 (HCFC 22 e HCFC 124).

O efeito esporicida do óxido de etileno pôde ser estudado mais profundamente em experimentos realizados por JUHLIN e colaboradores (62), nos quais foi encontrado grande potencial microbicida mesmo após término da exposição ao agente esterilizante, de catéteres constituídos em borracha de látex, poli (cloreto de vinila), usualmente conhecido como PVC, e silicone, inoculados com esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372. Os resultados obtidos pelos autores direcionam à conclusão de que esse efeito possa ter sido causado pela dessorção do gás a partir dos catéteres, tendo se mostrado diretamente proporcional ao período de exposição ao agente. Alguns microrganismos constituintes do "bioburden" do produto (*Pseudomonas sp*, *Micrococcus sp* e *Bacillus sp*) foram também expostos ao óxido de etileno adsorvido no material, evidenciando decréscimo no número de sobreviventes similar ou superior ao dos esporos dos indicadores biológicos, confirmando o efeito esporicida pós-ciclo.

2.2.2. Âmbito de Aplicação

Desde sua descoberta 1859, o óxido de etileno tem sido empregado em inúmeras sínteses orgânicas, e adicionalmente é considerado o agente esterilizante gasoso mais largamente utilizado nos Estados Unidos (21). Foi primeiramente utilizado com inseticida em 1928, sendo que um ano mais tarde, foi patenteado numa mistura com dióxido de carbono para aplicação na destruição de microrganismos e pragas, sendo também utilizada, assim como formaldeído, na desinfecção de salas hospitalares. Nova patente descrevendo o óxido de etileno como agente esterilizante foi estabelecida por GROSS e DIXON, em 1933 (51). Posteriormente, durante os anos 40, foi construído, pelo exército americano, laboratório para realização de estudos de efetividade do óxido de etileno como agente fumigante e esterilizante (20).

A utilização do óxido de etileno como agente esterilizante para aplicações médicas foi primeiramente descrita por PHILLIPS e KAYE no final dos anos 40 (93), como resultado de trabalho desenvolvido nos laboratórios do exército americano, sendo que na década seguinte, MC DONALD (83) obteve patente de processo para esterilização de produtos médico-hospitalares e afins, empregando mistura de óxido de etileno e clorofluorcarbono (20).

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 (20). Entre esses produtos encontram-se os artigos médico-hospitalares, fabricados em grande parte com materiais poliméricos. Em experimento realizado por FURUHASHI e MIYAMAE (48) foi investigada condição esterilizante ideal para vários ítens médico-hospitalares de natureza polimérica, abrangendo tubo de transfusão intravenosa, tubo de circulação extracorpórea, tubo endotraqueal, catéteres, luvas cirúrgicas, cânulas, tubo para anestesia epidural e membranas para hemodiálise, constituídos de PVC, látex, politetrafluoretileno, polietileno, silicone e cuprofano. Segundo outros autores, tipos de materiais médicos termolábeis para os quais se recomenda o óxido de etileno como agente esterilizante incluem algodão hidrófilo, compressas, tampões descartáveis, curativos adesivos e campos operatórios (31, 86).

A abrangência de uso do óxido de etileno não se restringe somente à sua utilização como agente esterilizante de artigos médicos hospitalares. Ainda nos anos 40, GRIFFITH e HALL (50) patentearam processo de fumigação de pimenta e borracha utilizando óxido de etileno puro sob vácuo (20).

A descontaminação e a esterilização de produtos na área alimentícia têm despertado grande interesse em estudos envolvendo a utilização do óxido de etileno como agente ativo, uma vez que a deterioração dos mesmos pode ser ocasionada pela presença de microrganismos. Devido a evidências de contaminação microbiana em especiarias, o emprego do óxido de etileno tem

se mostrado importante e sua eficácia está perfeitamente comprovada, desde que sejam definidas corretas condições de concentração gasosa, umidade relativa, temperatura e tempo de exposição. Nesse sentido, MURAZ e CHAIGNEAU (87) submeteram duas especiarias, cravo da índia e pimenta branca à esterilização com óxido de etileno, no sentido de verificar a cinética de absorção do gás pelas duas amostras.

Seguindo esta linha, em trabalhos adicionais CHAIGNEAU (22) promoveu estudos envolvendo a descontaminação de plantas medicinais como melissa, tomilho, alecrim, bem como especiarias, tais como salsa, pimenta branca, noz moscada, canela do ceilão, cravo da índia, pimentão e cebola. Em seus estudos os autores concluem que, apesar da grande efetividade antimicrobiana do óxido de etileno, há que se desenvolver estudos adicionais quanto à sua adsorção nos materiais, assim como a formação de etileno-glicol e etileno-cloridrina. Estes derivados mostraram-se responsáveis por alterações indesejáveis, tais como descoloração parcial, modificação do aroma e perda de componentes essencias de certas especiarias devido, por exemplo, à oxidação de alcalóides (22, 87).

RIES e colaboradores (103), trabalhando com peças implantáveis fabricadas com polietileno de alto peso molecular, material que não pode ser submetido à radiação ionizante devido à alterações químicas intrínsecas promovidas nos mesmos, optaram pela sua esterilização empregando óxido de etileno. Empregaram neste estudo peças ligadas à articulação de joelho (patela e tíbia), as quais foram inoculadas com esporos de *Bacillus subtilis* var *niger* e posteriormente submetidas a ciclos esterilizantes. O procedimento se mostrou eficaz e seguro, não promovendo alterações na estrutura do material.

2.2.3. Residual no Produto

2.2.3.1. Fator de risco e determinação analítica

Tendo em vista a utilização segura do óxido de etileno na esterilização de produtos médicos, "guidelines" oficiais e semi-oficiais têm sofrido alterações frequentes nos últimos anos e suas revisões têm resultado na adoção de limites máximos cada vez mais baixos para níveis de óxido de etileno em áreas de trabalho e de estocagem, assim como deste e de seus produtos de degradação, etileno-cloridrina e etileno-glicol, em produtos médico-hospitalares esterilizados (107). Ambos os produtos de degradação podem ser formados, respectivamente, pela interação do óxido de etileno com íons cloro e com a água, durante o processo de esterilização (20).

Algumas metodologias têm sido descritas para determinação desses resíduos, cujo início é geralmente processo extrativo a partir dos materiais esterilizados, seguindo metodologia analítica por cromatografia gasosa. Como alternativa, MA WU e MALININ (81) trabalharam com determinação de etileno-cloridrina e etileno-glicol em tecidos humanos, mais precisamente tecido ósseo e membrana de dura-mater usados em transplantes, empregando após extração, análise por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, utilizando padrões de etileno-cloridrina e etileno-glicol para obtenção de curva de calibração. O método mostrou elevada sensibilidade, reprodutibilidade, simplicidade e rapidez na determinação de resíduos em tecidos, apresentando vantagem em relação à cromatografia gasosa convencional que, segundo os autores, apresentam problemas como longos tempos de retenção e baixa sensibilidade.

É de grande importância a metodologia utilizada para extração dos resíduos dos materiais médicos que antecede a análise, conforme constatado

por CHIOUA e colaboradores (24) em trabalho realizado com seringas descartáveis de polipropileno. Foram utilizadas cinco extrações diferentes (diferentes temperaturas, solventes e tempo de extração), sendo encontrados valores de óxido de etileno variando entre 47 ppm (partículas por milhão) e 4,3 ppm quando os extratos foram analisados por cromatografia gasosa.

Sabe-se atualmente a importância da adoção de metodologias extrativas capazes de disponibilizar baixos níveis residuais de óxido de etileno. LAO e colaboradores (69), trabalhando com cromatografia gasosa, utilizaram três diferentes métodos extrativos aplicados a dois tipos de material polimérico (PVC e polietileno de alta densidade) e concluíram serem todos adequados na detecção de baixos níveis residuais de óxido de etileno, da ordem de 2,8 a 42,3 μg/g.

Os danos causados por esses resíduos podem ser de natureza amplamente diversa. RIES e colaboradores (103) relatam possibilidade de ocorrência de queimadura química em tecidos humanos decorrentes de peças implantáveis com níveis residuais ainda altos de óxido de etileno.

DAVOIS e colaboradores (31) e MURAZ e colaboradores (86) trabalharam com esterilização de alguns materiais hospitalares muito utilizados como chumaços de algodão, compressas, campos operatórios, curativos adesivos e não adesivos, encontrando também resíduos de etileno-cloridrina e etileno-glicol que variaram conforme a natureza do produto, presença de íons cloro e cinética de dessorção do gás, propondo investigação de novas metodologias no sentido de acelerar essa dessorção e diminuir a formação desses resíduos.

Os parâmetros que determinam e influenciam os níveis residuais pós-processamento em um produto médico podem ser divididos em duas categorias: fixos (solubilidade do gás, raio de difusão do gás, espessura do material a ser esterilizado e sua embalagem), assim como variáveis (velocidade

de trocas de ar, temperatura de aeração e configuração do produto/material de embalagem) (133).

A solubilidade do óxido de etileno em um material afeta diretamente seu nível residual no mesmo, ou seja, à medida que a solubilidade decai, menor quantidade de gás penetrará no produto, resultando em nível residual pós-processamento sensivelmente menor. Por exemplo, o gás possui maior solubilidade em PVC do que em polietileno; desta maneira, um produto confeccionado em PVC conterá níveis residuais maiores do que o mesmo produto confeccionado em polietileno. Isto pôde ser obsevado em experimentos realizados por JUHLIN e colaboradores (62), onde foi encontrado maior absorção de gás por catéteres de PVC do que por catéteres de silicone e látex.

Dados similares foram obtidos por LYARSKII e colaboradores (74), que estudaram a absorção do óxido de etileno por PVC, polietileno e silicone, tendo sido encontrado o maior coeficiente de sorção para o PVC (28,8 $cm^3/cm^3.atm$) e o menor para o polietileno (1,7 $cm^3/cm^3.atm$), coeficiente esse diretamente proporcional à concentração de gás e independente da temperatura. Por outro lado, quanto maior o raio de difusão do gás através de um material, menor será o tempo necessário para ser atingida sua dessorção completa. Constitui-se um exemplo o fato do silicone possuir um maior raio de difusão do gás do que o PVC, consequentemente, o silicone é um material de maior facilidade de aeração do que o PVC. Dados obtidos pelos mesmos autores mostraram valor máximo de coeficiente de difusão para o silicone em relação aos demais materiais estudados, o que possibilitou a dessorção de grande parte do gás nos primeiros cinco minutos, tendo a velocidade aumentado com a elevação de temperatura.

Com relação à influência exercida pela velocidade de trocas de ar na eliminação de resíduos, produtos estocados sob condições de trocas dinâmicas (ou forçadas) de ar necessitarão de menor tempo para remoção do gás, comparativamente àqueles mantidos sob condições estáticas de trocas de ar

(não forçadas). RIES e colaboradores (103) obtiveram para o polietileno de alto peso molecular utilizado na fabricação de peças implantáveis de tíbia, níveis de resíduos abaixo do permitido segundo normas estabelecidas pela FDA e ISO (100 e 364 ppm, respectivamente) após período mínimo de 3 dias sob aeração forçada. Em outro experimento, DELATTRE e colaboradores (32) submeteram PVC rígido, PVC flexível e polipropileno esterilizados por óxido de etileno a condições de quarentena com temperatura e pressão ambientes e constataram que sob essas condições, tanto o PVC flexível como o polipropileno necessitam de 25 dias para atingir níveis residuais aceitáveis pela FDA, sendo que o PVC rígido necessita de tempo muito mais longo, aproximadamente 12 meses de quarentena.

Quando a temperatura na aeração é aumentada, a cinética de energia do sistema também se eleva, resultando num decréscimo no tempo total de aeração requerido.

Embalagens primárias, secundárias ou terciárias podem restringir a difusão do gás e influenciar o tempo de aeração. Como exemplo tem-se que produtos embalados em invólucros constituídos em 100% polietileno tendem a requerer maior tempo de aeração do que aqueles embalados em invólucros permeáveis ao gás, como papel/polietileno ou Tyvek^{R} (95). É também mencionada influência exercida por embalagens mais elaboradas, por exemplo com três camadas, que retardam a dessorção do gás (31).

Deve ser enfatizado que a intensidade de absorção do óxido de etileno é também dependente diretamente de fatores inerentes ao próprio processo esterilizante como temperatura de esterilização, tempo de exposição, concentração de gás e tipo de mistura utilizada. Portanto, para cada combinação de parâmetros escolhida para diferentes processos de esterilização e aeração, poderão ser encontrados diferentes resultados de níveis residuais nos diferentes materiais (133).

2.2.3.2. Processo de Aeração

O processo de aeração dos materiais esterilizados é de importância fundamental na remoção de resíduos de óxido de etileno e seus sub-produtos, etileno-cloridrina e etileno-glicol. Cuidados adicionais devem ser tomados com relação a ítens médico-hospitalares usados em contato direto ao paciente. 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 (121).

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 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. Dados obtidos por FURUHASHI e MYAMAE (48), os quais posicionaram tubos de PVC em aerador (54^0C, 60% de umidade relativa, 25 trocas de ar/hora) e em sala comum. Na primeira situação, os níveis caíram de 3300ppm para 14ppm após 24 horas e para 3ppm após 48 horas, enquanto que na segunda, após 5 dias, os níveis ainda persistiam em cerca de 100ppm.

Os parâmetros pré-estabelecidos para o processo influenciam grandemente o tempo requerido para a remoção dos resíduos. A temperatura exerce impacto significante, proporcionando redução no tempo total de aeração quando a 60^0C, comparativamente a 50^0C. FURUHASHI e MYAMAE (48) também investigaram o efeito da temperatura sobre níveis residuais e observaram sua queda para tubos de PVC aerados sob temperatura de cerca de 54^0C em relação a temperaturas de cerca de 25^0C. Não foi encontrada relação entre níveis residuais e umidade relativa no interior do aerador.

Objetivando conhecer condições que pudessem proporcionar redução otimizada dos níveis residuais em materiais após esterilização, MATTHEWS e colaboradores (82) realizaram experimentos comparando a dessorção do óxido de etileno a partir de diferentes materiais poliméricos (PVC, neoprene, silicone) quando procedendo a aeração em câmara convencional e câmara microondas, ambas à temperatura de cerca de 55^0C. Foi constatada relativa eficiência das microondas em acelerar a dessorção do gás a partir de todos os materiais analisados. Uma vez que resíduos oferecem potencial risco quando do uso em pacientes, este processo poderia ser usado para reduzir rapidamente os resíduos a níveis aceitáveis logo após serem removidos da câmara esterilizante, uma vez que houve um ganho de tempo de 400% em relação ao processo convencional.

Propriedades inerentes ao material devem ser consideradas, como composição, espessura, configuração, peso 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 retém o gás e necessitam aeração. O PVC tem sido constatado como sendo o tipo de material de maior dificuldade na aeração (62, 74, 121).

Resultados interessantes foram encontrados por VINK e PLEIJSIER (133) com relação a influência da espessura de materiais poliméricos diferentes. Em aeração realizada em câmara com ar forçado circulante à temperatura ambiente, foram encontrados em PVC de 0,25m de espessura, níveis residuais de 3080 μg/g imediatamente após a esterilização, e menores que 1μg/g após 15 dias de aeração. Num outro extremo, para PVC de 1mm de espessura, foram encontrados valores de 3590μg/g e 190μg/g, respectivamente, nos mesmos momentos. Valores discrepantes também foram encontrados para outros polímeros investigados como o polipropileno, policarbonato, e outros.

Ressalta-se a importância de se submeter cada material a processo de validação a fim de se determinar sob quais condições devem ser processadas a esterilização e aeração, atingindo eficácia do processo, assim como níveis residuais seguros e compatíveis com legislação vigente. Geralmente os níveis residuais variam entre 25 e 250ppm, valores estes estabelecidos pela FDA em 1978 (82), dependendo de específica aplicação do material em questão.

2.2.4. Resíduo Ambiental: Aspectos de Engenharia e Ocupacional

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 700ppm, nível este muito acima do limite indutor de efeitos tóxicos. Os efeitos nocivos podem ser de natureza diversa, como irritação ocular, dérmica e respiratória, náuseas, vômitos, depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) 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 "Ocupational Safety and Health Administration" (OSHA) estabeleceu limite de 1ppm ambiental para jornada de trabalho diária de 8 horas, sendo que em 1988 foi acrescentado limite para exposição a curto prazo de 5ppm (112, 122) comentam que esse limite pode ser criticável, uma vez que limites menores podem causar trocas entre cromátides irmãs. Eles realizaram estudos com trabalhadores expostos a níveis abaixo de 1ppm para determinar se efeitos a nível celular acontecem mesmo em baixos níveis de exposição. A metodologia utilizada consistiu de medida do grau de alquilação da hemoglobina (como medida de dose tecidual) e determinação de trocas entre cromátides irmãs em cultura de linfócitos

periféricos e células bucais esfoliadas (como medida biológica). Os autores concluíram que estudos citogenéticos não são úteis ou adequados para mostrar efeito de baixo nível de exposição (em torno de 0,38ppm). Adicionalmente, teste de alquilação de hemoglobina realizado em fumantes demonstrou não ser possível separar efeito do tabagismo e efeito decorrente de exposição a baixos níveis de óxido de etileno.

A existência de unidades de esterilização por óxido de etileno em grande parte dos hospitais a 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. KORPELA e colaboradores (67) verificaram que embora o óxido de etileno seja mais pesado do que o ar, a mistura tende a seguir correntes de ar mais quentes logo após término de ciclo e abertura da porta do esterilizador. Esta tendência torna importante a colocação de exaustores eficientes imediatamente acima da porta, além de mantê-los nos locais convencionais preconizados. Além disso, cuidado interessante consiste na localização do esterilizador em sala isolada, devendo ser o equipamento provido de mecanismo automático de abertura da porta após o término do ciclo esterilizante, bem como o uso pelos operadores de máscaras de respiração com filtros adequados.

Trabalho prospectivo envolvendo aspectos de engenharia ocupacional foi realizado por ELLIOT e colaboradores (36), os quais vistoriaram 20 hospitais norte americanos e mensuraram os níveis de óxido de etileno em diversas situações. Como esperado, os locais que possuíam controles de engenharia e manutenção efetivos e assíduos, aliados a correta execução de procedimentos, apresentaram níveis menores que os detectáveis, enquanto que ausência de controle efetivo aliada a práticas inadequadas no trabalho rotineiro resultaram em níveis inaceitáveis de exposição ocupacional.

Uma vez que o processo de esterilização por óxido de etileno é extremamente complexo, pois agrega muitas variáveis a serem controladas, torna-se imperativa a disponibilidade de metodologias que permitam mensurar parâmetros inerentes ao próprio processo, situação esta exigida em processos de validação de novos procedimentos operacionais e equipamentos.

A concentração gasosa no interior da câmara esterilizante é obtida através da aplicação de pressão negativa de vácuo com posterior introdução do gás até atingir certa pressão positiva, determinada através de cálculos complexos (20). Por isso, metodologias que possam confirmar que a concentração de gás requerida foi realmente atingida dentro da câmara têm sido pesquisadas. Trabalho recente seguindo esta linha foi desenvolvido por ZHU e colaboradores (134), no qual foi usado espectrômetro de microondas acoplado a amostrador diretamente ligado à válvula de acesso a câmara esterilizante. O equipamento foi calibrado com óxido de etileno com nível de pureza superior a 99,8%, proporcionando excelente especificidade. De acordo com os autores, o nível de exatidão obtido foi o melhor reportado até hoje para esse tipo de equipamento. Paralelamente, foi desenvolvido modelo matemático capaz de prever a dinâmica de distribuição de concentração gasosa dentro da carga submetida a ciclo esterilizante.

FRIEBEN e colaboradores (46) desenvolveram sonda especial de amostragem para cromatografia gasosa que pode ser inserida no interior da câmara e permite mensurar concentração de gás e umidade no interior de pós submetidos a ciclo esterilizante.

O uso de misturas esterilizantes em substituição ao óxido de etileno puro nos processos esterilizantes hospitalares impulsionou o desenvolvimento de metodologia capaz de determinar a exata concentração de óxido de etileno na mistura. Uma possibilidade de metodologia quantitativa empregando determinação por espectroscopia infra–vermelho apresentou vantagem com

relação à cromatografia gasosa por reduzir o tempo de análise em aproximadamente cinco vezes (25).

É de suma importância a monitoração assídua de locais de trabalho, e para isto se prescinde de metodologias que reunam características de sensibilidade, especificidade, execução fácil e custo acessível. Nesse sentido, alguns estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de solucionar os problemas envolvendo esta questão.

Um grande passo foi dado por CUMMINS e colaboradores (26) em trabalho que objetivou o desenvolvimento metodológico agregando amostragem e quantificação de óxido de etileno em locais de trabalho. O procedimento envolve o uso de tubo amostrador contendo ácido hidrobrômico, que reage com o gás resultando em 2-bromoetanol. Segue-se dessorção com dimetilformamida e formação de éster heptafluorbutirato, o qual é extraído com iso-octano e analisado por cromatografia gasosa. Este esquema analítico se mostrou muito sensível e foi usado para mensurar níveis de óxido de etileno de 0,1ppm. Foi observado também que os tubos preenchidos com amostra e estocados à temperatura ambiente por duas semanas se mantiveram estáveis, podendo ser normalmente mensurados desde que a umidade relativa se mantenha em observados níveis entre 70 e 80% durante o armazenámento. Baixa umidade relativa (cerca de 5%) provocou perda de 20% da amostra devido à decomposição do 2-bromoetanol.

Encontram-se disponíveis no mercado vários tipos de tubos reativos (monitores químicos) para mensurar óxido de etileno ambiental, tornando-se necessários estudos de validação a fim de verificar sua eficiência. São classificados como métodos passivos e possuem reduzida complexidade de análise, grande estabilidade química e custo reduzido. Sua desvantagem consiste na questionável habilidade em atingir precisão de aproximadamente 35% em mensurar limites de 5ppm para curtos períodos de exposição estabelecido pela OSHA em 1988. SZOPINSKI e colaboradores (122)

realizaram investigação no sentido de avaliar três dosímetros passivos (3M 3550/3551™, Crystal Diagnostics AirScan® e Assay Technology EO CHEM CHIP™). Cada um deles funciona de maneira distinta. O primeiro utiliza técnica do 2-bromoetanol e posterior análise por cromatografia gasosa. O segundo utiliza sistema de reagente colorimétrico e a leitura é realizada "in locco", juntamente com controle negativo. O último utiliza o princípio de nucleação e crescimento cristalizado, proporcional à concentração de óxido de etileno. Todos foram submetidos às mesmas condições experimentais e os resultados desta validação mostraram ser o monitor da 3M® o único a atingir exatidão de 35% em mensurar níveis de 5 ppm em períodos de curta exposição conforme estabelecida pela OSHA.

2.2.5. Aspectos de Toxicidade

O óxido de etileno é usado extensivamente como intermediário na síntese de vários compostos químicos e somente pequena proporção é usada para esterilização em hospitais e indústrias. Entretanto, esta última aplicação é a principal responsável pela exposição ocupacional porque o processo tem sido muitas vezes realizado em locais impróprios e sob condições inadequadas de segurança.

Na década de 1970 o óxido de etileno já vinha sendo produzido e utilizado em larga escala na Europa e Estados Unidos, e só se conheciam como efeitos provenientes de exposição ocupacional humana a irritação e sensibilização da pele. Entretanto, estudos disponíveis na época mostravam potencial mutagênico em alguns insetos como drosophila, barley e *Neurospora crassa.* Posteriormente, aberrações cromossômicas foram observadas em

células de medula óssea de ratos e em linfócitos de pessoas expostas acidentalmente. Estas observações impulsionaram estudos de toxicidade humana e alertaram para o risco de ser o óxido de etileno um agente carcinogênico humano. Entre 1972 e 1977 foram relatados alguns casos de leucemia em fábrica onde o gás era utilizado na esterilização de ítens hospitalares, sendo os trabalhadores expostos ativa (operadores de equipamentos esterilizantes) e passivamente (elementos que desenvolviam atividades em ambiente onde eram estocadas caixas recém esterilizadas). Medidas realizadas constataram níveis de 2 a 70 ppm na sala de estocagem, cerca de 20ppm no nível de altura das vias respiratórias da população feminina, 1500ppm dentro das caixas esterilizadas e 150ppm externamente às caixas. Foi então estabelecido pelo National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) que o limite de 50ppm para exposição diária no trabalho não deveria ser excedido (58).

Estudos mais recentes elucidaram ser o óxido de etileno potente agente alquilante, com alta afinidade por centros de nucleofílicos fortes, como grupos sulfidrila e cisteína em proteínas de N-guanidina no ácido desoxirribonucéico (DNA). A alquilação acontece na posição 7 da guanina para formar N-7-hidroxietil-guanina. No âmbito da citologia, trocas entre cromátides irmãs representam o quarto estágio de mudança no DNA de celulas somáticas normais, sendo que um número espontâneo desse evento acontece normalmente. A grande maioria de agentes alquilantes induzem a maior incidência de trocas entre cromátides irmãs. Estes eventos poderiam ser considerados medida indireta de mutações e portanto, indicação de potencial risco genético (70).

Conforme os mesmos autores (70), a metodologia de trocas de cromátides irmãs mostrou-se útil na detecção de alterações genéticas provocadas pelo óxido de etileno quando as doses inaladas foram da ordem de 280 a 3200 ppm durante dois anos. Os indivíduos estudados evidenciaram

aumento significativo na frequência de trocas entre cromátides irmãs, em comparação com grupo controle, tendo também exercido influência o tabagismo.

Entretanto, estes resultados contrastam com dados obtidos por HANSEN e colaboradores (53), os quais investigaram, em trabalhadores expostos comparativamente a grupo controle, a ocorrência de trocas de cromátides irmãs, sendo que não foi encontrada diferença entre os grupos. Os autores comentaram que os resultados favoráveis foram ocasionados pela baixas doses de exposição a que foi exposto o primeiro grupo (50ppm para 8 horas diárias e 75ppm para exposição de curta duração, ou seja, 15 minutos), insuficiente para provocar esse tipo de alteração.

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. Entretanto, ainda há discrepâncias entre os nítidos efeitos carcinogênicos em animais experimentais e as observações em humanos expostos, nos quais não são comprovados, têm sido muito debatidos. Há que se considerar ainda existência de fonte endógena de óxido de etileno, metabolicamente formado a partir do etileno, constituinte natural do organismo. Assim, fontes endógenas também contribuem para a alquilação fisiológica de macromoléculas, como hemoglobina e DNA (13).

Exposição a outros compostos derivados indicam conversão "in vivo" à óxido de etileno. Trabalho realizado por GRANATH e colaboradores (49) mostrou que trabalhadores expostos a eteno em indústria de plásticos foram avaliados e constatou-se formação de óxido de etileno no interior do organismo.

Outra avaliação de transformação endógena foi obtida por BOLT e colaboradores (12), que empregaram nova metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) envolvendo derivação com fenil-glioxal e detecção através de fluorescência para mensurar alterações da guanina do

DNA em células sanguíneas, envolvendo a formação de óxido de etileno a partir da biotransformação do etileno endógeno.

Baixas doses de exposição (2 a 5ppm por 8 horas diárias durante 3 meses) a que foram expostos 75 trabalhadores em indústria brasileira que utilizava óxido de etileno como intermediário, ocasionaram aumento estatisticamente significante de aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos em linfócitos binucleados, enquanto que em células de mucosa bucal não houve diferença significativa entre grupo exposto e grupo controle, possivelmente devido à constante renovação sofrida por estas células e ao reduzido contato entre o gás e a boca, que não se constitui na principal via de entrada do gás. Para os indivíduos que apresentaram alto índice de aberrações cromossômicas, foi medido o grau de alquilação da hemoglobina, sendo observada grande ocorrência desse evento; entretanto, não foi constatada diferença significativa quando comparado a grupo controle não exposto a óxido de etileno, mas possivelmente a outros agentes químicos (102).

Análise de linfócitos sanguíneos periféricos de indivíduos que trabalhavam em planta de produção de óxido de etileno e outros empregados de central de esterilização no período de 1983-1984, expostos profissionalmente a níveis que variaram de 4 a $9mg.g^{-3}$ de óxido de etileno revelaram elevada frequência de aberrações cromossômicas (64). Mais uma vez o tabagismo esteve associado, mas não com relação a grupo exposto e grupo fumante, e sim entre fumantes e não fumantes do grupo controle, nos quais a diferença na frequência de aberrações foi significativa.

Metodologias adicionais utilizadas na monitoração biológica têm sido estudadas no sentido de otimizar e adequar medidas confiáveis. POPP e colaboradores (100) trabalharam com excreção urinária de ácido hidroxi-etil-mercaptúrico (HEMA) em urina de 24 horas de trabalhadores expostos, além da avaliação de danos ao DNA de linfócitos e frequência de trocas de cromátides irmãs. A determinação de HEMA na urina mostrou-se adequada na

diferenciação entre trabalhadores expostos e não expostos, mas não para biomonitoração individual, uma vez que foram detectadas concentrações elevadas mas com alta variação entre os indivíduos estudados, e ausência de correlação com exposição ao óxido de etileno. Os resultados das duas outras metodologias indicaram que é necessária padronização dos grupos considerando fatores como estilo de vida, uma vez que, por exemplo, o tabagismo também provoca alterações celulares e deve ser levado em consideração.

Efeitos hematológicos também foram utilizados na avaliação de exposição ocupacional em 68 mulheres empregadas em 9 hospitais americanos, utilizando contagem sanguínea total e diferencial. Foi encontrado decréscimo significante no hematócrito e níveis de hemoglobina, aumento na percentagem de linfócitos, relativo decréscimo na percentagem de neutrófilos e número total de células brancas inalterado. Entretanto, essa metodologia tem sido questionada, uma vez que alguns dos resultados não mostraram relação significante com exposição ocupacional ao óxido de etileno (113).

Outros eventos têm sido utilizados na investigação de exposição ocupacional, além de aberrações cromossômicas e troca entre cromátides irmãs, entre eles simulação de fitohemaglutinina, cinética de ciclo celular e síntese de DNA induzida por luz ultra-violeta em linfócitos sanguíneos periféricos (76).

O tabagismo foi considerado por FUCHS e colaboradores (47) grande promotor de alterações celulares. Foram avaliados 97 trabalhadores expostos ocupacionalmente envolvidos na esterilização de produtos médicos em hospitais e plantas industriais, grupo este constituído de fumantes e não fumantes. Para fumantes, a extensão de danos ao DNA de células sanguíneas mononucleares periféricas foi relevante e em parte dependente do tabagismo. Entretanto, efeitos deletérios ao DNA foram mais claramente observados em não-fumantes, sendo que os autores consideram também a necessidade de

estudos adicionais a serem adotados, considerando os dois grupos em separado.

Trabalhadores de centrais de esterilização em hospitais que não utilizavam nenhum equipamento individual de proteção relatavam existência de odor de óxido de etileno, dores de cabeça, formigamento de extremidades, irritação ocular, irritação de mucosas, naúseas, vômitos, problemas respiratórios e perda da sensibilidade ao cheiro do gás, sintomas esses típicos de exposição a níveis elevados diários (19). Um caso de asma ocupacional e dermatite de contato foi relatado em hospital da Bélgica onde cirurgião em treinamento utilizava luvas esterilizadas a óxido de etileno (130). Após mudança para uso de luvas esterilizadas por radiação, os sintomas desapareceram.

Na tentativa de se alcançar maior esclarecimento quanto a alterações neurológicas e neuropsicológicas, ESTRIN e colaboradores (41) conduziram avaliação em trabalhadores de área esterilizante hospitalar, os quais sofreram exposição crônica ao óxido de etileno em níveis que variaram de 15 a 250ppm, em comparação a grupo controle não submetido à exposição. O primeiro grupo apresentou deficiência de reflexo dos tendões e baixa performance em testes envolvendo aparelho psicomotor do que o grupo controle. Além disso, apresentaram maiores níveis de depressão e ansiedade, sendo que não foi detectada diferença na velocidade de condução de impulso nervoso, e o eletroencefalograma (EEG) foi similar em ambos os grupos.

Exposição crônica em níveis muito baixos (4,7ppm de óxido de etileno em 8 horas diárias durante 5 anos) sugere possibilidade de ocorrência de efeitos neurotóxicos crônicos, mais precisamente prejuízo cognitivo e disfunção de personalidade, dados esses obtidos mediante avaliação de grupo submetido a exposição diária e grupo controle (66).

A principal via de acesso do óxido de etileno no organismo é a inalatória. Resultados de estudos de toxicidade induzida por outras vias (sub-cutânea,

intramuscular, intraperitoneal e intravenosa) realizados em ratos, camundongos e cobaios mostraram que o gás provoca múltipla intoxicação de órgãos e sistemas vitais, efeitos esses dose-dependentes. Durante efeitos agudos e crônicos, prevalecem transtornos funcionais do sistema nervoso, fígado, rins, sangue e atividade geral do organismo, sendo que, no caso de dose única (1mg/kg), o gás mostrou baixa toxicidade. As vias intra-venosa e intra-peritonial foram as mais nocivas (75). No caso específico de cobaios, segundo AMDUR e MEAD (1), a concentração a partir da qual são observados sinais de intoxicação é da ordem de 300ppm.

Absorção percutânea através de tecido impregnado com óxido de etileno foi estudada por WESTER e colaboradores (140), que posicionaram discos de poliéster na superfície de pele de cadáveres, juntamente com sistema especial de difusão tamponado. A absorção foi de 1,3% da dose quando o sistema foi aberto ao ar cincundante, e aumentou para 46% quando a superfície sofreu oclusão com luvas de látex, sendo que o processo foi rápido, ocorrendo durante as primeiras 4 horas de ensaio. A absorção química foi confirmada e os autores enfatizam o risco potencial da exposição ocupacional através das vestimentas e transferência para pele.

Apesar dos vários estudos de toxicidade utilizando animais, AUSTIN e colaboradores (7) analisaram cuidadosamente os riscos de extrapolação dos resultados para humanos, principalmente porque entidades de regulamentação como a OSHA (Occupational Safety and Health Agency) e a EPA (Environmental Protection Agency) têm se baseado em tais testes para definir limites de exposição. Os autores ressaltam a necessidade de se levar em consideração alguns fatores como definição de "risco" e "risco aceitável", dados experimentais utilizados, aspectos de modelo utilizado para definir a dose aceitável segura e o método utilizado para extrapolar padrões de exposição experimental de espécies animais para humanos e padrões de exposição.

Episódios de ativação do sistema complemento e presença de anticorpos IgE contra óxido de etileno têm sido descritos em pacientes submetidos a sessões de hemodiálise nas quais foram utilizados dialisadores esterilizados com este gás. De acordo com achados de LEMKE e colaboradores (73), dos 120 pacientes estudados, 13 apresentaram pelo menos um episódio de hipersensibilidade aguda, enquanto que os demais mostraram hipersensibilidade de moderada a ausente. Entretanto, somente seis apresentaram elevados níveis de anticorpos circulantes IgE, e também não foram encontradas diferenças no grau de ativação do sistema complemento entre os pacientes apresentando reações de hipersensibilidade severas, moderadas ou nulas.

Trabalho adicional realizado por MASIN e colaboradores (79) empregando seis tipos de membranas dializadoras diferentes fabricadas em acetato de celulose, éster de celulose saponificado e celulose-cupramônio, que haviam sido esterilizadas por óxido de etileno, e ainda com níveis residuais, revelou fenômenos de hipersensibilidade em sete pacientes submetidos a sessão diária. As consequências aos pacientes foram observadas no primeiro minuto do procedimento de diálise e incluíram dores de cabeça, hipotensão, sudorese, broncoespasmos, dispnéia, taquicardia, entre outros. Os autores concluíram que as reações observadas são provavelmente relacionadas ao contato do gás com o sangue dos pacientes, embora outros mecanismos não possam ser excluídos como causas adicionais.

2.3. Óxido de Etileno e Diluentes

2.3.1. Introdução

O óxido de etileno é produzido comercialmente pela oxidação catalítica do gás etileno e é um dos principais produtos químicos produzidos nos Estados Unidos, sendo que dados de 1984 relatam um total de 5,83 bilhões de toneladas anuais produzidas no país. Em razão de sua alta reatividade, o óxido de etileno é largamente utilizado como intermediário na produção de vários produtos, entre os quais estão o etilenoglicol para tecnologia de resfriamento (30%), poliésteres (30%), etanolaminas e surfactantes não iônicos para uso na produção de detergentes (12%) (26, 67). A produção destes e de outros compostos responde por mais de 99% de todo o uso de óxido de etileno produzido nos Estados Unidos, enquanto que menos de 1% é usado em aplicações esterilizantes (20). Na Bélgica, o consumo total de óxido de etileno foi de 170.000 toneladas em 1980; desse total, somente 0,07% foi utilizado para esterilização de produtos médicos (70).

Órgãos Governamentais como a EPA (Environmental Protection Agency) publicaram normas na intenção de listar o óxido de etileno como potencial poluente do ar, estabelecendo limites para emissão na atmosfera. Uma vez liberado na atmosfera, o óxido de etileno é eventualmente convertido a sub-produto de periculosidade reduzida através de reação da fase gasosa com radicais hidroxila, processo que requer cerca de 100 a 215 dias. A reação do óxido de etileno com o ozônio da atmosfera é considerado praticamente nula, sendo entretanto considerado poluente atmosférico. Para contemplar padrões estabelecidos de emissão ambiental de óxido de etileno, têm sido estudados sistemas de remoção e descarte acoplados ao próprio equipamento esterilizante. O mais utilizado é o sistema de "scrubbers" ácidos, provido de reservatório contendo água e ácido ou base em proporção balanceada. Nele

ocorre reação de hidrólise, formando etileno-glicol, reação esta otimizada em condições extremamente ácidas (geralmente ácido sulfúrico), permitindo o máximo de conversão. Outro sistemas incluem incineração, conversão catalítica e condensação, esta última permitindo reutilização do óxido de etileno (20).

O óxido de etileno é fornecido comercialmente na forma pura (100%) ou diluído em outros gases inertes de forma a reduzir riscos de inflamabilidade e explosividade, constituindo as chamadas misturas esterilizantes (18). Os gases inertes mais comumente utilizados têm sido o clorofluorcarbono 12 ou dicloro-difluormetano (CFC-12), o dióxido de carbono (CO_2), o nitrogênio (N_2), e em proposta mais recente, os hidroclorofluorcarbonos (HCFCs) (8).

O uso dos compostos CFCs encontra-se atualmente sob intensa discussão em razão da potencial depleção da camada de ozônio. A preocupação de que os compostos CFCs contribuem diretamente para um alerta global resultou em consenso internacional de que esses compostos deveriam ser retirados de uso. Em 1987, foi firmado o "Acordo de Montreal sobre Substâncias que Agridem a Camada de Ozônio", tendo sido assinado por 24 nações e no qual são estabelecidas metas drásticas de redução de consumo (77). Embora as misturas que utilizam CFCs respondam por cerca de 2 a 5% de todo CFC utilizado domesticamente, foram incluídas nos termos do acordo.

A partir de dezembro de 1989 os CFCs foram sobretaxados, dobrando o preço de mercado da mistura mais utilizada (12/88) que agrega CFC-12 e óxido de etileno, nas proporções de 12% e 88%, respectivamente. Imposição de taxa excessiva, aliada ao fato de ser necessário consumo oito vezes maior da mistura, em comparação ao óxido de etileno 100%, para atingir concentrações comparáveis de exposição, acarreta para este situação mais competitiva (20).

Algumas indústrias têm optado pela instalação de sistemas de recuperação, os quais chegam a exibir 80% de eficiência. Deve ser ressaltado também que o custo de engenharia para instalações que utilizam óxido de

etileno 100% puro é muito maior devido a necessidade de uso de equipamentos a prova de fogo e explosão, bem como instalação de controles adequados (20).

Tendo em vista essas considerações, estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de se encontrar misturas alternativas. Misturas agregando óxido de etileno e compostos HCFCs já são disponíveis no mercado, embora sob intensa investigação. Resultados preliminares indicam que elas podem substituir adequadamente a mistura 12/88. As vantagens decorrem do fato do HCFC exibir potencial de depleção de 50 a 100 vezes menos do que o CFC-12, pois é mais lábil e se dissocia antes de atingir a camada de ozônio. Além disso, a mistura também apresenta como característica ausência de inflamabilidade e explosividade, bem como características termodinâmicas muito próximas da mistura 12/88, requerendo pouca ou nenhuma modificação na engenharia de equipamentos (8, 106).

2.3.2. Ação biológica de diluentes

Foram feitas algumas investigações no sentido de avaliar possível efeito microbicida de alguns diluentes, supostamente inertes. Em trabalho realizado por HEALY e colaboradores (55) encontrou-se efeito inibitório no desenvolvimento de colônias, durante a fase lag e sobre a respiração bacteriana em oito espécies microbianas por parte de solventes halocarbonos, incluindo triclorofluormetano (freon 11), diclorofluormetano (freon 21), clorodifluormetano (freon 22) e halotano, sendo que o grau inibitório dependeu do tipo de solvente em particular e da sua concentração.

Em trabalho mais recente, SOUSA e colaboradores (119) investigaram particularmente a atividade esporicida e bactericida do triclorotrifluoretano (freon 113) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger*. Os resultados confirmaram ação bactericida sobre

formas vegetativas nas condições avaliadas (adição de freon 113 a suspensões de microrganismos contidas em tubos de ensaio), enquanto que os esporos bacterianos não foram afetados.

Com relação à ação microbicida de distintas formas de emprego do agente esterilizante, interessantes esclarecimentos decorreram de estudos comparativos entre a mistura esterilizante contendo 10% de óxido de etileno e 90% de HCFC quando comparado à óxido de etileno 100%. Foram desafiados inóculos da ordem de 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC), contendo sete diferentes microrganismos: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, nas formas vegetativas, e *Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus circulans* e *Mycobacterium chelonei*, na forma esporulada. Os resultados obtidos evidenciaram a equivalência de ação esterilizante entre a mistura recentemente desenvolvida e o agente não diluído (2).

Com relação à toxicidade de compostos CFCs e HCFCs, os dados são ainda restritos. Limitados estudos em animais indicam potencial hepatotoxicidade desses compostos. Investigação realizada por HOET e colaboradores (57) correlacionaram doenças do fígado com situação na qual nove trabalhadores sofreram exposição repetida acidental à mistura de HCFC 123 e HCFC 124, compostos estes incluídos entre os possíveis substitutos dos CFCs. Ambos os compostos foram metabolizados a halotano e biopsia de fígado revelou necrose hepatocelular, bem como foram encontradas proteínas trifluor-acetiladas nos hepatócitos sobreviventes, assim como anticorpos contra P450, 2E1 e P58, associados com hepatite causada por halotano. O mecanismo de hepatotoxicidade não é conhecido, mas provalvelmente os efeitos são similares aos causados por solventes ou outros anestésicos halogenados.

A via de acesso dos compostos CFCs e HCFCs relacionada à exposição ocupacional é geralmente a inalatória, sendo que a absorção para CFC 11,

CFC 12 e HCFC 22 é considerada de média à alta, tendo provavelmente comportamento toxico-cinético similar. A biotransformação desses compostos tem sido considerada baixa, mas possível. Os mais importantes efeitos toxicológicos dos CFCs são sua influência no sistema nervoso central e coração, onde causam arritmias e palpitações. Os CFCs investigados têm de pouca a nenhuma atividade mutagênica ou carcinogênica (89).

É razoável supor que os HCFCs, substitutos potenciais dos atualmente empregados CFCs, possuem efeitos toxicológicos similares. Não há informações precisas neste sentido para a maioria dos compostos substitutos, entretando, inúmeras pesquisas estão em andamento nos Estados Unidos. O ideal é que a avaliação de risco dos substitutos dos HCFCs sejam baseadas em publicações científicas antes que os mesmos sejam comercializados (89). Alguns substitutos como amônia, dióxido de enxofre e ácido fórmico podem provocar efeitos mais sérios após exposições agudas do que exposições similares aos CFCs. Ainda, o dióxido de carbono e alguns hidrocarbonetos podem também agir como agentes asfixiantes. Os próprios CFCs acidentalmente inalados em altas concentrações podem configurar alto risco, principalmente em ambientes pouco ventilados.

A avaliação da toxicidade dos substitutos HCFCs tem sido efetuada em paralelo com o desenvolvimento industrial dos mesmos. Um grupo internacional representando a maioria dos produtores mundiais de CFC desenvolveu o Programa para Teste de Toxicidade de Fluorocarbonos Alternativos (PAFT), dentro do qual se tem conduzido estudos toxicológicos para os HCFCs 123, 124, 125 e 134a. Os resultados sugerem baixa ordem de toxicidade aguda para estes compostos, entretanto, adicionais investigações com relação à toxicidade proveniente de exposições crônicas e contínuas devem ser desenvolvidas com o objetivo de comprovar o uso seguro dos substitutos (124).

DODD e colaboradores (35) avaliaram a toxicidade dos substitutos HCFC 123, HCFC 124 e HCFC 142b usando 2 espécies de ratos, "Fischer 344" e

"Sprague-dawley", os quais foram expostos a doses inalatórias de 1%(v/v) por 2 horas, sendo que não houve diferença significativa entre as duas espécies. Os animais expostos a HCFC 123 e 124 excretaram ácido trifluoracético na urina, bem como apresentaram pequenas quantidades de metabólitos 2-cloro-trifluoretano e 2-cloro-difluoretileno no fígado. Estudos farmacocinéticos adicionais revelaram presença dos metabólitos na circulação sanguínea, tendo esta sofrido redução com o decaimento da dose inalada (de 1% a 0,01%).Os estudos evidenciam a necessidade de se prosseguir com investigações toxicológicas adicionais envolvendo todos os substitutos potenciais.

2.3.3. Importância e Riscos à Camada de Ozônio

O ozônio compreende apenas cerca de três em 10 milhões de partes da atmosfera da Terra, entretanto realiza várias funções críticas no balanço radioativo da Terra. A atmosfera é constituída de mistura de gases sob constante bombardeamento pela radiação solar, com comprimentos de onda na banda do visível (400-700nm), de modo que a sobrevivência de cada componente químico é determinada por suas propriedades. Os gases atmosféricos mais abundantes nitrogênio, oxigênio e argônio, respectivamente nas proporções de 78%, 21% e 0,9%, são transparentes à radiação visível e à maioria da radiação ultra-violeta (UV), esta última mais energética e menos abundante. Entretanto, a radiação UV com comprimentos de onda menores que 242 nm é absorvida pelo O_2, levando à foto-dissociação em dois átomos de oxigênio. O destino usual de tais átomos separados, em combinação com moléculas de oxigênio, é a formação de moléculas de ozônio (106).

A existência do ozônio na atmosfera é natural consequência da interação entre o oxigênio molecular e a luz, conforme explicado de forma pioneira nos anos 30, e por sua vez o destino mais comum do ozônio é a fotólise. Esse

processo acontece desde que o oxigênio tornou-se parte da atmosfera à milhões de anos atrás. De acordo com atuais teorias da evolução, a vida não poderia ter deixado o mar e povoado a terra sem algum tipo de proteção na faixa entre 250nm e 300nm do espectro, logo, nós devemos nossa existência à camada de ozônio, e sua perda traria consequências catastróficas (37).

O ozônio age como barreira protetora contra radiações ultra-violeta do sol, responsáveis pelo aumento na incidência de câncer de pele, cataratas oculares, queimaduras solares, envelhecimento precoce da pele, possível supressão do sistema imune, bem como inúmeros efeitos climáticos (59). Muitas biomoléculas, incluindo DNA, absorvem e são danificadas por radiação, iniciando o efeito ao redor de 300nm e extendendo-se até a faixa do ultra-violeta. Existe controvérsia quanto à faixa de comprimentos de onda sobre a qual o ozônio proporciona barreira protetora efetiva, podendo ser de inferior a 250nm ao intervalo entre 250nm, 210nm e 290nm (106). Entre 250nm e 300nm, a filtração ocorre muito acima da camada de ozônio. De 300nm até o visível a atmosfera é transparente, porém biomoléculas não são sensíveis a essa faixa de comprimento de onda.

A absorção da radiação UV pela camada de ozônio é bastante intensa, de natureza exotérmica, provocando o aquecimento da superfície da atmosfera ao redor e originando uma região chamada estratosfera (de 10 a 50Km acima da terra). Entretanto, a camada de ozônio é tênue e está espalhada principalmente acima de altitude de 30Km, havendo um revestimento de ozônio puro de 3mm de espessura (72).

Estima-se que 1% de depleção do ozônio pode aumentar a quantidade de raios ultra-violeta que atinge a superfície da terra em 3%, e que esse aumento produziria desastrosas consequências, que vão desde o decréscimo na produção de alimentos até o aumento na incidência de câncer. Os cálculos matemáticos utilizados para determinar essas estimativas são extremamente complexos, principalmente porque existem pelo menos 192 reações químicas e

48 processos fotoquímicos ocorrendo simultaneamente na estratosfera. A maioria desses processos são muito rápidos e envolvem entidades altamente reativas, particularmente radicais livres e átomos em estado excitado, cujas reações podem afetar a estratosfera mesmo a muito baixas concentrações (80). Algumas dessas entidades incluem radicais da família do oxigênio (OH e HO_2) e da família do nitrogênio (NO e NO_2), os quais reagem com a molécula de ozônio (37). O equilíbrio entre estas reações é responsável pela manutenção da integridade da camada de ozônio na estratosfera, assim como sua interação como outras entidades químicas reativas.

2.3.3.1. Efeito estufa

O efeito estufa tem merecido estudo e a atenção de vários autores e entidades internacionais(9, 37, 84, 85, 104, 105, 106, 117).

A absorção de raios UV pela molécula de ozônio envolve conversão de sua energia em fonte de calor na atmosfera superior. Este fenômeno é a causa da inversão de temperatura a altitudes entre 15 e 50 Km, situação esta que define a estratosfera como tendo um gradiente de temperatura de cerca de 2250K à cerca de 15Km até 2750K à 50Km (situação encontrada anteriormente, normal). A quantidade total de energia solar que entra na atmosfera terrestre deve ser efetivamente equilibrada com aquela emergente. A absorção de radiação infra-vermelha (IR) por moléculas na atmosfera é seguida por re-emissão em todas as direções, inclusive para baixo, em direção da superfície da terra, e escape para o espaço. Isto provoca aumento no nível de emissão terrestre de radiação no espectro infravermelho, para permitir o equilíbrio entre a energia que chega e a emitida. Este aumento acarreta elevação da temperatura na superfície terrestre, tendo provocado elevação dos calculados 225^0K para os atuais 288^0K (106).

O aumento da concentração atmosférica de moléculas como CO_2, CH_4 e CFCs, que são capazes de absorver radiação infra-vermelha, é acompanhado de adicional aumento do escape dessa radiação para o espaço, seguido de incremento posterior da temperatura da superfície terrestre. Os CFCs são também chamados de "greenhouse gases" por apresentarem relação direta com o aquecimento global da terra. Cada molécula de CFC é 10.000 vezes mais eficiente em impedir que a energia em forma de calor seja irradiada para o espaço do que uma molécula de dióxido de carbono, conhecida como o principal "greenhouse gas". Os autores ainda consideram que o aquecimento global devido ao efeito estufa pode resultar em destruição ambiental em larga escala, quebra nas colheitas e degelo das calotas polares, o que ocasionaria inúmeros eventos desastrosos (6).

Segundo metereologistas, o aumento progressivo de dióxido de carbono, metano, CFCs e outros gases acarretarão aumento na temperatura média global de $3,0 \pm 1,5\ ^0C$ até o ano de 2050 (104).

2.3.3.2. Efeitos dos clorofluorcarbonos

Os CFCs são compostos halogenados desenvolvidos como alternativas seguras em substituição à amônia e dióxido de enxofre na indústria de refrigeração, já que a amônia é inflamável e ambos são extremamente tóxicos. Estes compostos constituem uma das classes químicas de substâncias de utilização mais abrangente até hoje desenvolvidas. Suas propriedades agregam estabilidade química, ausência de flamabilidade, corrosibilidade, explosividade e toxicidade. Graças a estas características, bem como às suas propriedades físicas, incluindo pressão de vapor e temperatura, baixa condutividade térmica na fase de vapor, características de solubilidade, compatibilidade com vasta

gama de materiais e alta estabilidade, encontraram emprego em ampla variedade de aplicações (84).

Após o emprego dos clorofluocarbonos (CFCs) por muitos anos, em meados dos anos 70 surgiram fortes indícios de que esses compostos estavam relacionados com a destruição da camada de ozônio da estratosfera. Essa depleção estaria associada com íons cloro presentes nos compostos CFCs, que devido a sua característica de inércia com relação a outras moléculas e à maioria dos processos biológicos, são transportados para a estratosfera, e então quebrados pela luz solar. Os íons cloro liberados, reagem cataliticamente com a molécula de ozônio (6, 80, 84).

A depleção do ozônio foi primeiramente observada sobre a região da Antartida, fenômeno este denominado "buraco do ozônio" (9, 37, 78, 84, 85, 104, 105, 106, 117). Segundo LEHMAN (72), um único átomo de cloro pode, estatisticamente falando, destruir 10^5 moléculas de ozônio antes de ser removido através de reações com outras moléculas como NO_2 e H_2O para produzir cloro-nitrato ($ClONO_2$) e ácido clorídrico (HCl), respectivamente. Entretanto, a cadeia de reações não termina nesse estágio. O cloro-nitrato e o ácido clorídrico gerados em latitudes médias são reconvertidos em cloro ativo nos pólos da Terra. As temperaturas polares na estratosfera são baixas no inverno (-80^0C), resultando na formação de nuvens estratosféricas polares. Na superfície das partículas de gelo dessas nuvens, reações químicas liberam cloro molecular a partir das moléculas de nitrato de cloro e ácido clorídrico. Durante a longa noite polar, uma enorme reserva de cloro molecular se acumula, mas os mesmos não reagem com o ozônio. Entretanto, quando o amanhecer polar ocorre sobre a Antartida, em agosto, são rapidamente convertidos pela ação da radiação UV em radicais cloro destruidores. Similar processo acontece com compostos contendo bromo molecular. Logo, a grande concentração dessas entidades reativas é responsável pelo enorme buraco observado sobre a Antartida.

De modo geral, os CFCs são transparentes entre 230 e 700 nm, e não sofrem fotólise na troposfera, apenas a nível de estratosfera, acima do ozônio, onde encontram os raios UV; são essencialmente insolúveis em água e não lavados com a chuva; e são inertes com relação a radicais hidroxila ou outras espécies oxidantes. Cada átomo de cloro é responsável por produção de reações catalíticas em cascata que resultam na destruição de 10^5 moléculas de ozônio durante 1 ou 2 anos, antes que somente alguns átomos reajam com a água das chuvas, formando ácido clorídrico (chuvas ácidas) (6).

Moléculas como $CHClF_2$ (HCFC22) e CH_3CCl_3, entretanto, se diferenciam da maioria dos outros compostos CFC pois são reativas com radicais hidroxila na troposfera; além disso, sofrem importante reação química na troposfera que destrói a maioria das moléculas antes que elas possam atingir e serem decompostas na estratosfera (106).

Segundo BARGIGIA (9), o CFC 11 permanece na atmosfera por cerca de 50 a 100 anos (média de 65 anos), enquanto que cálculos realizados para CFC 12 revelaram um tempo de vida de 100 a 150 anos (média de 120 anos). Com relação a outros compostos halogenados como CFC 113, CFC 114, CFC 115, halon 1211 e halon 1301, estimam-se tempos de vida de, respectivamente, 90, 180, 380, 25 e 110 anos. Portanto, mesmo com toda a produção interrompida, não fosse o Protocolo de Montreal, a contribuição dos CFCs para o quantidade de átomos de cloro na atmosfera aumentaria de um fator de 5 a 10, e atingiria fator de 10 a 20 em meados dos anos 2000, bem como os efeitos se fariam sentir vários anos adiante (37). Um tempo de vida de 110 anos corresponde a 36% de sobrevivência das moléculas de CFC 12 em 1988 até 2100, sendo que 6% dessas moléculas ainda estarão na atmosfera do ano 2300 (106).

As concentrações atmosféricas de vários compostos CFCs em 1988 estavam na faixa de 0,1-0,6 partes por bilhão (ppb) por volume de ar. Os mais abundantes, em ordem decrescente de conteúdo de átomos de cloro, eram: CFC12, CFC11, cloreto de metila (CH_3Cl), tetracloreto de carbono (CCl_4), metil-

clorofórmio (CH_3CCl_3) e CFC 113. O conteúdo total destes compostos cresceu rapidamente nas últimas décadas, na razão de 0,8 ppb em 1950, 1,0ppb em 1970 e 3,5 ppb em 1987, portanto, mais de 1,0 ppb por década (106).

De acordo com reações troposféricas que podem ocorrer ou não com diversos compostos CFCs, eles podem ser agrupados em 4 categorias: CFCs perhaletos saturados, os quais são transparentes na troposfera, não sofrendo nenhum tipo de reação nesta faixa do espectro, somente reações de decomposição quando em contato com radiação UV e comprimentos de onda ao redor de 293nm (ex: CFC12 e CFC 11); moléculas olefínicas contendo ligações duplas carbono-carbono (C=C), as quais são susceptíveis a rápida destruição pelo ataque de radicais hidroxila (OH) na troposfera e possuindo tempo de vida em torno de 1 ano ou menos (ex: $CHCl=CCl_2$, $CCl_2=CCl_2$); HCFCs ou hidroclorofluorcarbonos contendo ligações C-H que podem também ser atacadas por radicais hidroxila na troposfera e tempos de vida variando de 1 ano ou menos até várias décadas, dependendo sobretudo da reatividade individual dessas ligações carbono-hidrogênio (C-H) (ex: cloreto de metila, HCFC 22 e CH_3CCl_3); moléculas que têm espectro de absorção mensurável em comprimentos de onda maiores do que 293nm, capazes de absorver e serem fotodissociadas em toda a troposfera, e tendo tempos de vida de poucos anos ou menos (106).

Observações relativas às reações possibilitadas pelas distintas estruturas moleculares forneceram base para classificar os CFCs em três classes com respeito ao seu potencial de causar depleção estratosférica do ozônio. Assim sendo, considera-se aqueles com (106):

- Muito alto potencial de depleção: quase todos os compostos dessa classe são clorocarbonos saturados, os quais sofrem reações importantes na estratosfera e portanto liberam todos seus átomos de cloro em altas altitudes à nivel da camada de ozônio: CCl4, CFC 11, CFC 12, CFC 113, CFC 114 e CFC 115. Outros fluorcarbonos

bromados com um único átomo de bromo ligado a cada carbono ($CBrF_3$ e $CBrF_2CBrF_2$) liberam bromo atômico na estratosfera e são considerados agentes depletores muito mais potentes do que os fluorocarbonos contendo um único átomo de cloro na molécula (106). WASHIDA e colaboradores (137) utilizaram uma câmara fotoquímica equipada com lâmpada UV adicionada de íons xenônio em arco voltaico, conseguindo demonstrar que o potencial de destruição do $CFCl_3$ (CFC 11) foi de 8, enquanto que para o $CBrF_3$, o potencial obtido foi de 40;

- Pouco potencial de depleção: os compostos dessa classe sofrem reações troposféricas e são susceptíveis à remoção na troposfera por processo de chuva ácida. Possuem ligação dupla entre átomos de carbono, por exemplo, $CHCl=CCl_2$, $CCl_2=CCl_2$; ligação C-H, por exemplo, HCFC 22, CH_3CCl_3, metil-cloride e metil-bromide; ou são moléculas possuindo dois ou mais átomos de bromo, por exemplo, CBr_3F;

- Insignificante potencial de depleção: perfluorocarbonos , por exemplo, CF_4 e C_2F_4, e hidroclorofluorcarbonos (HCFCs), por exemplo o HCFC 134a, estão nessa categoria. Os primeiros possuem característica de permanecer inalterados na atmosfera por milhares de anos, então com risco extremamente alto em agravar o "efeito estufa". Por outro lado, os HCFCs possuem tempo de vida na atmosfera comparativamente curto em razão de sua reatividade com radicais hidroxila na troposfera, minimizando sua chegada à estratosfera.

Atualmente dispõe-se de poderosas ferramentas na análise de futuras mudanças na camada de ozônio, decorrentes do uso continuado dos compostos halogenados por anos seguidos, em passado recente. Simulações

laboratoriais dos mecanismos de dissociação e absorção do ozônio, bem como posterior análise espectroscópica, têm contribuído para melhor entendimento das suas propriedades químicas e do seu comportamento frente ao balanço de íons e radicais encontrados na atmosfera hoje (78). Modelos matemáticos complexos têm sido usados na avaliação da carga de íons cloro e bromo presentes na atmosfera (141), na determinação e quantificação de radicais ionizados que participam diretamente na remoção do ozônio da estratosfera (45), bem como outros estudos envolvendo avaliação da quantidade de ácido clorídrico (HCl) e ácido fluorídrico (HF) na estratosfera através de satélite (108) têm sido úteis na demonstração de que a liberação dos CFCs continuará influenciando a atmosfera e a vida humana por muitos anos subsequentes.

2.3.3.3. Aplicação e Consumo dos Clorofluorcarbonos

Dados entre 1960 e 1970 revelaram ser os Estados Unidos o maior produtor desses compostos, cerca de 136 toneladas por ano, enquanto que o resto do mundo respondia por um total de 38 toneladas por ano. Entretanto, estudos projetaram que em 1974, as fontes produtoras fora dos Estados Unidos responderiam por 47% de toda a produção mundial de propelentes para aerosóis (59).

O emprego do CFC 12 e CFC 11 expandiu rapidamente nos Estados Unidos após a Segunda Guerra Mundial, aumentando aproximadamente 10% por ano durante quase três décadas. A produção Européia atingiu esse patamar poucos anos depois. A liberação atmosférica global de CFC 12 e CFC 11 atingiu 100.000 toneladas em 1960 e 1965, respectivamente, e tem permanecido na faixa entre 300.000 a 450.000 toneladas para CFC 12 , bem como 250.000 a 300.000 toneladas para CFC 11 desde 1975. Quando a

produção dos outros CFCs é incluída, o total de liberação dos mesmos na atmosfera atingia, no início da década de 1970, aproximadamente 1 milhão de toneladas de CFCs por ano (59).

Os primeiros compostos CFCs foram sintetizados nos anos 20 na tentativa de encontrar um agente refrigerante satisfatório. O diclorodifluormetano (CCl_2F_2 ou CFC 12 ou Freon 12) tem sido o composto mais utilizado na refrigeração de geladeiras domésticas e ar condicionado de automóveis. Adicionalmente, outros compostos voláteis inertes como o CFC 11 (CCl_3F), CCl_2FCClF_2 (CFC 113) e $CHClF_2$ (HCFC 22) têm encontrado extensivo uso como propelente de aerosóis (mistura CFC 12/CFC 11), na expansão de espumas plásticas (CFC 11), limpeza de componentes eletrônicos (CFC 113) e ar-condicionado residenciais (HCFC 22), bem como numa gama enorme de outras aplicações, sendo que em quase todas elas, os compostos CFC são liberados intactos na atmosfera, mais cedo ou mais tarde (106). Sua vasta aplicação era decorrente de suas propriedades não-corrosivas, ausência de flamabilidade, presença de conveniente ponto de ebulição e exibição de baixa toxicidade, essa última característica a mais importante.

A utilização dos CFCs englobava, nos anos 70, indústria de refrigeração, produção de solventes, uso como agente espumante na fabricação de polímeros expandidos e como propelentes em aerosóis (seu maior uso). O uso em aerosóis foi banido em 1977, mas eles ainda eram largamente utilizados como agentes refrigerantes e agentes expansores na produção de polímeros, sendo os de maior emprego o CFC 11 ($CFCl_3$) e o CFC 12 (CF_2Cl_2) (37, 80, 84).

Embora a quantidade de CFCs usados na esterilização de produtos médicos seja considerada insignificante, os mesmos têm sido questionados por profissionais na área da saúde em todo o mundo. Não há estimativa exata dos uso desses produtos em medicamentos aerosóis nos Estados Unidos, entretanto, dados de 1987 são provenientes da Dinamarca, onde 1,18 milhões de unidades medicamentosas em aerosol foram vendidas para uso médico,

principalmente para tratamento de asma e rinites alérgicas, o que totalizava 29 toneladas de CFCs contidos nos frascos e posteriormente liberados para a atmosfera (6).

Ainda na área médica, mais especificamente no campo da esterilização, os CFCs são utilizados em misturas esterilizantes de artigos médico-hospitalares termossensíveis, os quais são submetidos a esterilização por gás óxido de etileno. Este gás, por apresentar algumas características indesejáveis como inflamabilidade e explosividade, necessita ser misturado a gases inertes, dentre os quais os CFCs são os mais utilizados. A mistura mais comumente empregada tem sido o Oxyfume 12^R, que agrega óxido de etileno e CFC 12, respectivamente, nas proporções de 12% e 88%. Entretanto, outras misturas vêm sendo desenvolvidas no sentido de suprimir a utilização do CFC 12, potencialmente danoso à camada de ozônio. Nesse sentido, ALFA e colaboradores (2) trabalharam com mistura alternativa que agrega óxido de etileno e HCFC, respectivamente nas proporções de 10% e 90%, e testaram sua efetividade, encontrando similar eficiência dessa mistura quando comparada `a mistura 12/88 usualmente empregada.

2.3.3.4. Regulamentação Internacional

Em 1975, foi efetuada a primeira tentativa de banir o uso dos CFCs como propelentes para aerosóis por 14 agências norte-americanas, sendo que em 1976, foi feita uma nova tentativa na qual se verificou efetivo progresso na substituição dos CFCs do mercado de propelentes, o que acarretou competição na busca de substitutos interessantes no aspecto técnico e econômico. Enquanto Canadá, Suécia e Noruega moveram-se rápido em direção à

legislação ou regulamentação do uso de propelentes CFCs, o Japão e a maioria dos países produtores de CFCs da Europa Ocidental (Inglaterra, Alemanha Ocidental, França e Itália) resistiram fortemente às restrições até 1987. Nos anos 80, o chamado "Grupo Canadense" (Estados Unidos, Canadá e Escandinávia) forçaram o empenho dos países europeus na diminuição da produção de CFCs (37).

A conferência de Viena, realizada na Áustria em março de 1985, reuniu 36 países, incluindo todos os maiores produtores de CFCs. Foi redigido documento com dois artigos que estabeleciam obrigatoriedade em tomar medidas apropriadas para proteger a sáude humana e o meio-ambiente contra efeitos adversos resultantes da modificação da camada de ozônio. Detalhamentos sobre quais medidas deveriam ser tomadas e quando deveriam vigorar foram deixadas para trabalho adicional chamado de "Protocolo de Controle de Produção, Emissão e Uso dos CFCs". Embora o protocolo incluísse todos os compostos CFCs e outras substâncias contendo cloro, não mencionava compostos bromados, os quais foram discutidos mais tarde na Convenção de Genebra, onde foi formulado o "Protocolo de Clorofluorcarbonos", em dezembro de 1986 (37).

Devido à crescente preocupação com relação à depleção da camada estratosférica de ozônio e principalmente pela extensão do buraco constatado na Antartida, em 1987 foi realizada a Conferência de Montreal, com a participação de diversos países, da qual resultou o "Protocolo de Montreal" para controle de futuras emissões de CFCs e que entraria em vigor em 10 de janeiro de 1989 (9, 37, 78, 84, 85, 104, 105, 106, 117). O protocolo continha quatro diretrizes básicas: limitação da proporção de emissão de CFCs, começando em 1990; redução da emissão em 20% abaixo do nível de 1986, tendo efeito até 1994; redução da emissão em 50% abaixo do nível de 1986, tendo efeito até 1999; permissão aos países sub-desenvolvidos para procederem à busca de tecnologias relacionadas aos CFCs com uma década de prazo em relação aos

países desenvolvidos. O protocolo incluiu uma lista específica de compostos CFCs: CFC 11, CFC 12, CFC 113, CFC 114, CFC 115 (37), bem como mencionou seus potenciais de destruição do ozônio, respectivamente de 1,0 , 1,0 , 0,8 , 1,0 e 0,6. Para os compostos halons 1211, 1301 e 2402, os quais contém átomos de bromo, atribuiu-se potencial de destruição muito maior, respectivamente, 3,0 , 10,0 e 6,0 (9).

Após a implementação do "Protocolo de Montreal", novas evidências científicas levaram à necessidade de sua revisão e fortalecimento, o que ocorreu em Londres, no ano de 1990, resultando nas "Emendas de Londres", as quais incluíam regras adicionais de redução na emissão das substâncias já regulamentadas, bem como a incorporação de outras substâncias depletoras do ozônio. Estas restrições adicionais, ou completa retirada de alguns compostos, bem como as novas inclusões, foram impulsionadas pela disponibilidade comercial de substitutos para todas as aplicações (33).

Novo encontro em Copenhagem, em 1992, antecipou a retirada dos CFCs, tetra-cloreto de carbono (CCl_4) e Halons 1301, 1211 e 2402 para janeiro de 1996 (105).

Extrapolando mais adiante, JONES (61) calcula que mesmo que todos os compostos halogenados fossem retirados até o ano 2005, a concentração de cloro seria esperada aumentar sete vezes mais do que o normal, de maneira que as perdas da camada de ozônio e o crescimento na exposição aos raios ultra-violeta B (UVB) seriam esperados em grandes áreas do globo terrestre. Seguindo esses raciocínio, uma perda de cerca de 10% no total do ozônio aumentaria a incidência de câncer de pele, mais precisamente de melanoma em 20%, carcinoma das células basais em 30% e carcinoma das células esquamosas em 50%. Essa perda significaria uma elevação total de 150.000 casos e de 600 mortes nos Estados Unidos, bem como 7000 casos na Inglaterra e 100 mortes, anualmente. Como a radiação ultra-violeta também

está diretamente associada ao aparecimento da catarata, 2,8 milhões de casos adicionais podem ocorrer ao nível internacional até o ano 2075 (138).

2.3.3.5. Novas tendências

Os clorofluorcarbonos são conhecidos serem os maiores contribuintes para a depleção da camada de ozônio. Entretanto, eles são importantes em muitos segmentos para a sociedade, sendo atitude irresponsável a interrupção imediata da sua produção. Por outro lado, a busca por substitutos adequados se torna difícil quando aspectos como toxicidade, flamabilidade, custo, impacto ambiental e propriedades físicas e químicas são considerados. Muitos candidatos têm sido selecionados pela indústria e trabalhos significantes de pesquisa e desenvolvimento estão em andamento.

Refrigeradores e condicionadores de ar, entre outros ítens inerentes à vida moderna, promoveram demanda no crescimento e surgimento de tecnologia avançada, bem como na busca por substitutos satisfatórios para os refrigerantes convencionalmente utilizados CFC 11, CFC 12 e HCFC 22. Foi sugerido o uso do HCFC 134a devido a seu baixo potencial de depleção e possiblidade de implantação de produção em escala industrial. Outros hidroclorofluorcarbonos têm sido investigados, como HCFC 142b, HCFC 152a (89). Há ainda que se considerar que mudanças drásticas tornariam necessária a re-engenharia de equipamentos, com consequente gasto adicional (37).

No caso dos propelentes, mistura de CFC 11 e CFC 12 foi o produto mais utilizado durante os anos 70. Mais tarde, as indústrias de alguns países, principalmente Estados Unidos, Canadá e Escandinávia iniciaram a sua

substituição por propano e isobutano, bem como passaram a empregar outros tipos de embalagens, "roll-on" ou bombas valvuladas. No caso de agentes expansores de polímeros, passou a ser usado o CFC 22 ao invés de CFC 11 e CFC 12, bem como cloreto de metileno (CH_2Cl_2) e pentano, embora com necessidade de avaliação de questões envolvendo toxicidade, flamabilidade e custo de produção (37). OLANDER (89) cita ainda a possibilidade de uso do ácido fórmico, metano, butano, pentano, HCFC 123 e HCFC 141b.

Outra questão muito discutida é a reciclagem dos CFCs, ao invés da sua liberação na atmosfera após uso único. Esta opção seria mais factível do que a produção, principalmente em se tratando de indústria de espumas plásticas. Por outro lado, a recaptura de pequenas quantidades, mas cumulativas, em refrigeradores usados ou outros ítens de consumo não parece ser opção efetiva em razão dos enormes esforços logísticos necessários (37).

Todos os agentes refrigerantes são confinados em circuitos canalizados, sendo possível coletá-los, canalizá-los ou destruí-los, porém é necessário equipamento especial e de custo elevado. Aproximadamente 400.000 refrigeradores são descartados por ano na Suécia e, atualmente, os CFCs presentes no interior desses equipamentos não são coletados (89).

OREMLAND e colaboradores (90) realizaram experimento no sentido de investigar a biodegradação como mecanismo para a retirada de compostos halogenados da atmosfera. Determinados microrganismos promovem a oxidação do HCFC 21 no solo sob condições anaeróbicas, e na água sob condições aeróbicas, enquanto que para o HCFC 123 só foi observada degradação sob condições anaeróbicas. Em alguns dos experimentos, a degradação dos HCFCs ocorreu até concentrações de partes por bilhão (ppb), aumentando a possibilidade de que bactérias presentes na natureza possam remover esses compostos da atmosfera.

MC FARLAND (84) menciona o emprego potencial dos HFCs, que por não possuírem cloro na sua estrutura, não acarretam potencial de depleção do ozônio. Entretanto, a eliminação do íons cloro causa aumento na pressão de vapor e decréscimo na solubilidade desses compostos quando comparados aos CFCs, o que limita seu uso para muitas aplicações. Ainda, segundo trabalho de WALLINGTON e colaboradores (136), esta classe de compostos não reage com a molécula de ozônio, embora entidades formadas pela oxidação atmosférica dos HFCs possam reagir com o ozônio. Os resultados dos autores evidenciaram que íons flúor resultantes de reação catalítica dos HFCs não participam da reação catalítica, bem como entidades contendo íons flúor não reagem com o ozônio, portanto não ameaçam o ozônio estratosférico.

Em 1992, o panorama geral do mercado de substitutos já se encontrava mais consolidado, com disponibilidade de alternativas para todas as aplicações comerciais. De acordo com estudos, compostos não-fluorcarbonos substituirão 30% do mercado de CFCs, enquanto que adicionais 30% serão reciclados, e as substâncias alternativas, HCFCs e HFCs, substituirão, respectivamente, 30 e 10% do mercado de CFCs (33).

2.4. Controle do Processo Esterilizante por Óxido de Etileno

2.4.1. Introdução

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 protocolo de validação do processo esterilizante. Adicionalmente, a validação inclui ítens relativos ao equipamento, instalações e incluindo qualificação da performance física, microbiológica 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" (42).

Juntamente com os indicadores físicos, que são instrumentos capazes de mensurar e acompanhar parâmetros pré-estabelecidos para determinado equipamento, deve-se mencionar a importância dos indicadores químicos. Sua grande importância consiste em mecanismo de identificação de fluxo, assegurando que o material tenha sido submetido ao processo, e não confirmando sua eficácia (34, 60, 107).

Os indicadores químicos baseiam-se na característica de determinadas substâncias químicas sofrerem alteração quando é atingido determinado parâmetro pré-estabelecido. Exemplos seriam tintas termocrômicas constituídas de carbonato de chumbo e sulfureto de lítio, que exibem mudança de coloração quando é atingida determinada faixa de temperatura. As tintas quimio-termocrômicas, constituídas de 4(4-nitrobenzil-piridina) e impressas em papel, sofrem reação química e mudam de coloração quando expostas ao gás óxido de etileno. Além de indicadores de fluxo, os indicadores químicos repartem com os indicadores físicos a habilidade de prover indicação imediata de falha no processo esterilizante, ou seja, que determinadas condições térmicas, químicas ou radioativas pré-estabelecidas não foram atingidas (34, 60, 107).

2.4.2. Indicadores e Monitores Biológicos

Os monitores biológicos constituem-se no recurso ideal para monitoração de processos esterilizantes do tipo destrutivo, ou seja traduzem diretamente a eficácia do processo. Pressupõe-se que estejam alocados nas posições mais inacessíveis ao agente esterilizante, no caso o gás, considerando a câmara e respeitando as características de embalagem e conformação do produto, permitindo resposta que integre todas as variáveis (28).

Com o intuito de padronização da terminologia, é interessante que se adote aquela descrita por SPICHER (120), que apresenta como monitor biológico o organismo teste, suporte, corpo de prova e embalagem. O indicador biológico, infelizmente, tem sido empregado para as mais diferentes situações, tendo em mente por vezes o microrganismo, este no suporte, incluso em corpo de prova, ou mesmo o monitor completo. Conceitualmente, o indicador biológico é a menor unidade do monitor biológico que contenha o organismo teste e que

literalmente possa ser manipulado separadamente, sem precauções especiais e sem viciar o sistema de teste.

Estudo efetuado por RUTALA e JONES (111) apresentou, para esterilização a vapor, comparativos de sensibilidade entre indicadores químicos, incluindo o Comply, Propper, Chemdi, Sterigage e Thermalog S, e indicadores biológicos, seja considerando os convencionais (Attest 1262, Proff Plus, Assert e Biosign) ou aquele de leitura rápida (Attest 1292). O resultado privilegiou os indicadores biológicos, independente do tempo de leitura, em detrimento dos químicos, que promoveram resultado falso quando sob tempos reduzidos de exposição.

Apesar do impacto que têm ocasionado na esterilização em autoclaves, os indicadores biológicos, também conceituados como dispositivos comercialmente disponíveis, de leitura rápida quanto à efetividade de esterilização à vapor (redução de 24 a 48 horas para duas a três horas apenas) (110, 131), não devem alcançar da mesma maneira a esterilização por óxido de etileno. A necessidade de período de aeração para reduzir ou eliminar a presença do agente esterilizante e seus derivados torna imperioso um período maior entre o processo esterilizante e a utilização do produto.

Ademais, observa-se que os estudos envolvendo indicadores de leitura rápida apenas atingem o ambiente hospitalar (110, 131). No caso de processos industriais, com critérios mais rígidos e inclusive com estrita aderência aos aspectos legais, há que se incorporar aos ítens que permitem a liberação do produto, a aprovação no teste de esterilidade (43, 127). Este período varia, conforme o compêndio obedecido, de 7 a 14 dias, portanto igual ou maior que o tempo necessário para a leitura do dispositivo convencional.

Permanecem válidas, na monitoração de processos esterilizantes por óxido de etileno, aspectos de influência na resistência dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (30, 98), incluindo o meio de cultura usado na sua obtenção e

a atividade de água nos mesmos. Nos indicadores biológicos, acresce a influência da temperatura e umidade relativa (92), e da presença de cristais (115). No caso dos monitores biológicos prevalecem adicionalmente como fatores de influência aspectos inerentes aos suportes (97) ou corpos de prova (99), inclusive quando relacionados à estabilidade (96).

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 traduzida pela letalidade do processo, sendo os esporos bacterianos, os sensores, os principais constituintes dos indicadores biológicos. 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 diretamente nas embalagens dos produtos a serem esterilizados.

A resistência dos esporos bacterianos deve ser obrigatoriamente superior a dos microrganismos originalmente presentes no material a ser esterilizado, em geral formas vegetativas bacterianas, chamados de carga natural do produto ou "bioburden" (68). Os esporos são inoculados em suportes apropriados a partir de suspensão padronizada em número de aproximadamente 10^6 microrganismos por suporte (4), sendo que a cepa utilizada dependerá do processo esterilizante a ser monitorado (107, 128). As cepas no geral indicadas para a monitoração dos processos esterilizantes são: para vapor *Bacillus stearothermophilus*, ATCC 7953; para calor seco *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 ou *Clostridium sporogenes* ATCC 12980; para gás óxido de etileno *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372; para radiação *Bacillus stearothermophilus* ATCC 9753 ou *Bacillus pumilus* ATCC 14884 (34).

Desde julho de 1980, a USP XX (127) tornou oficial o critério de aceitabilidade quanto à resistência dos esporos destinados ao emprego como indicadores biológicos, expresso como valor D de aproximadamente três minutos. Os testes da USP XIX (126) requeriam tempos de exposição de 15 a

120 minutos, 54 ± 2^{0}C de temperatura, 60 ± 10% de umidade relativa e 600 ± 15mg de óxido de etileno por litro. Já a USP XX introduziu intervalos de tempos de 0, 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. Os pontos, consistindo de uma média de cinco indicadores cada, eram usados para o cálculo do valor D (91,127). OXBORROW, KALLANDER e colaboradores (91), que desenvolveram estudos comparativos com o método de Stumbo, comentam a importância em monitorar ciclos esterilizantes por óxido de etileno empregando indicadores biológicos. SHINTANI e colaboradores (116), trabalhando em condições experimentais empregando um "biological indicator evaluator resistometer" (BIER) obtiveram consistência nos valores D obtidos, independente do método de determinação empregado: método da curva de sobreviventes (EN), procedimento Stumbo-Murphy-Cochran (SMCP) e Limited Spearman-Karber (LSKP).

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 distingua de contaminações acidentais, sendo que, numa feliz coincidência, o *Bacillus subtilis* apresenta pigmento alaranjado quando do seu cultivo em meios apropriados (95).

Em termos históricos, o emprego de esporos no controle da letalidade microbiana data do início da bacteriologia, tendo KOCH em 1881, usado terra de jardim entre camadas de linho para determinar se o calor e vapor penetravam nas camadas de tecido. Em 1897, KILMER inoculou gaze e algodão com *Bacillus antracis* e cultivou o material por 7 dias, após o mesmo ter sido submetido a processo esterilizante, alojado internamente a um lote de paramentação hospitalar (107).

A preparação dos indicadores biológicos envolve diversas etapas, desde o cultivo do microrganismo desejado, a obtenção de suspensão microbiana, a

padronização quanto ao número de esporos, o inóculo em suportes adequados, a secagem e a inclusão em embalagens apropriadas, que devem permitir o acesso ao agente esterilizante, bem como configurar barreira microbiológica (4, 95). O uso de meio líquido sintético na produção dos esporos de *Bacillus subtilis* (29, 56) não influenciou a resistência dos mesmos, tendo sido verificado resultados idênticos para os esporos produzidos neste e no tradicional meio sólido complexo.

2.4.2.1. Características de resistência dos Monitores Biológicos

A resistência dos esporos bacterianos é devida à existência de camada extra de revestimento, bem como à presença de ácido dipicolínico que, quando complexado ao cálcio, confere proteção às enzimas dos esporos (60). Entretanto, de acordo com estudos de DADD e DALEY (27), há evidências de que a resistência dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* poderia ser aumentada pela presença de grupos tióis, ou seja aumento do número de grupos alquiláveis, fazendo com que a alquilação pelo óxido de etileno deixe de ser letal. Além disso, a produção da camada extra pode ser influenciada por aspectos nutricionais do meio de esporulação, condição válida para cepas de *Bacillus subtilis* EV 15, apesar de não parecer simples esta correlação, pois para outras cepas como *Bacillus subtilis* 4673, *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium* isso não foi verificado.

BLOOMFIELD (11) esclarece que tratamento dos esporos com iodo produziu extração da camada proteica externa dos esporos, efeito esse potencializado em presença de hidróxido de sódio (NaOH), embora não tenha

detectado evidência de liberação de ácido dipicolínico. A concentração de 1000ppm de iodo produziu perda total da camada num período de 60 minutos, conduzindo à rehidratação do protoplasma dos esporos e aumentando sua susceptibilidade a agentes biocidas.

A norma ISO 11138 (115) enumera especificações consideradas essenciais para a suspensão de esporos anteriormente ao inóculo nos suportes adequados, bem como ressalta a importância do tipo de suporte. SHINTANI (115) realizou estudos na tentativa de identificar suporte, meio de cultura e suspensão ótimos para promover a exatidão dos valores D obtidos com os indicadores biológicos. O estudo mostrou que variabilidade nos valores D não foi devida a fator único, mas a uma combinação do tipo de suporte e de suspensão. De acordo com os resultados, o autor sugere como ideais o uso de papel de filtro como suporte, bem como água destilada ou salina para suspensão dos esporos. Com relação ao meio de cultura, diferentes valores D foram encontrados de acordo com diferentes meios de cultura, sendo que a composição mais apropriada merece, para definição, experimentos adicionais.

Diferentes condições de estocagem dos indicadores biológicos preparados influenciaram sua resistência ao vapor e ao óxido de etileno, segundo REICH e MORIEN (101). Em experimento conduzido com esporos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus*, estocados sob temperaturas variando entre -20^0C e $+20^0C$, e umidade relativa variando entre 0 e 66%, foi possível observar que indicadores biológicos estocados sob umidade relativa entre 0% e 20^0C tiveram sua resistência e viabilidade significantemente afetadas. Houve decréscimo da população e aumento da resistência para ambas as cepas devido à perda de água pela dessecação, efeito que deve ter atingido parte da população e provocado a perda de água de hidratação de alguma estruturas celulares, levando a um rearranjo das mesmas e dificultando o acesso do agente esterilizante. Os autores recomendam que ambiente com

umidade inferior a 20% deve ser evitado, a fim de manter estável e previsível padrão de resistência dos indicadores biológicos.

A letalidade de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica, sendo esse fenômeno representado pelo modelo de curva semi-logarítmica de sobreviventes. A representação gráfica do logarítimo decimal de sobreviventes em relação ao tempo de exposição, à temperatura constante, resulta em curva linearizada decrescente, onde log N_0 é o logarítimo decimal da população microbiana inicial no tempo zero (60).

Matematicamente, a resistência do indicador biológico é representada em termos de valor D (Tempo de Redução Decimal), sendo o principal parâmetro de avaliação das características de resistência de uma população microbiana homogênea (123, 128, 139). O valor D representa o intervalo de tempo necessário, nas condições definidas, para a destruição de 90% da população inicial de esporos em minutos, ou seja, é o intervalo de tempo exigido para a curva de decaimento percorrer um ciclo logarítmico (5,60). Quanto maior o valor D, maior é a resistência da população microbiana em questão, ou seja, é necessário maior tempo para reduzir a população microbiana em 90%. Assim, o tempo total do processo equivale ao múltiplo do tempo de redução decimal.

Considerando processo térmicos, a velocidade de destruição microbiana está diretamente relacionada à temperatura, ou seja, à medida que aumenta a temperatura, ocorre o acréscimo na velocidade de destruição microbiana. Assim, valor Z representa o intervalo de temperatura necessário para a redução de 90% do valor D, representando o intervalo de temperatura que ocasiona aumento de 10 vezes na velocidade de destruição (132).

2.4.3. Validação do processo

Nos últimos 10 anos, os indicadores biológicos foram crescentemente se tornando instrumento na validação de processos esterilizantes. Considerando os diversos processos esterilizantes, a validação permite assegurar que o processo cumpra os fins para os quais foi programado, ao mesmo tempo que demonstra que todas as etapas e parâmetros especificados podem ser controlados repetitivamente. Um processo de validação é aplicado, por exemplo, quando se adquire equipamento novo, quando há necessidade de modificação de equipamento já em uso rotineiro ou mesmo quando se modifica algum parâmetro do processo que vinha sendo executado rotineiramente (5,129).

A validação constitue-se basicamente de quatro etapas, a saber (5, 129):

- Qualificação das instalações: estabelecem que os equipamentos, controles e instrumentos foram adequadamente projetados e calibrados;
- Qualificação operacional: confirmam que a câmara vazia funciona adequadamente conforme os parâmetros pré-estabelecidos por escrito;
- Estágio confirmatório: compreende a esterilização propriamente dita de materiais;
- Estágio final: estágio no qual todas as etapas anteriores são detalhadamente documentadas.

Adicionalmente ao emprego dos indicadores biológicos em validação de processos, seu principal emprego concentra-se no controle de processos rotineiros de esterilização (5).

3. OBJETIVO

Avaliar a influência de distintas misturas de óxido de etileno, tendo como diluentes CFC 12 e HCFCs 22 e 124, sobre a letalidade de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372.

Estudar os efeitos de distintas concentrações (450mg/L e 600mg/L) do agente esterilizante e temperaturas utilizadas no processo (45^0C, 55^0C e 65^0C) sobre os valores de redução decimal (D) do *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, quando empregando misturas de óxido de etileno em CFC 12 (Oxyfume 12^R) e HCFCs 22 e 124 (Oxyfume 2002^R).

Proceder a monitoração ambiental tendo em vista a detecção de resíduos de óxido de etileno, conforme recomenda a Portaria Interministerial n^O 482, publicada em sua versão final em 19 de abril de 1999.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Material

Foi objeto desse estudo a nova mistura esterilizante disponível comercialmente sob a denominação Oxyfume 2002^R, fornecida pela White Martins, em cilindros de 150Kg, uma das opções de volume além de 62Kg e 11Kg, na mistura de óxido de etileno, HCFC 124 e HCFC 22, respectivamente nas proporções de 10%, 63% e 27%. Adicionalmente, foi utilizada a mistura usualmente empregada, comercialmente disponível sob a denominação Oxyfume 12^R, de mesma procedência, em cilindros de igual capacidade, na mistura de óxido de etileno e CFC 12, respectivamente nas proporções de 12% e 88% em porcentagem de volume.

Para possibilitar os estudos de letalidade foi desenvolvido trabalho de obtenção de suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger*, ATCC 9372 (95), padronizada quanto à carga microbiana, veiculada em suportes celulósicos e acondicionada em embalagem filme-papel grau cirúrgico, constituindo assim os monitores biológicos. Foram adquiridos para inclusão nos estudos monitores biológicos comerciais, produzidos pela 3M sob a marca Attest^R (cod. 1264), disponíveis em embalagens de 100 unidades. Consistem em sistema integrado com indicador de pH, o azul de bromotimol, e foram submetidos às mesmas condições experimentais de desafio daqueles produzidos laboratorialmente, permitindo parâmetro de comparação quanto à sua letalidade e resistência.

Também o óxido de etileno se constituiu em objeto de estudo quando em concentração residual no ambiente. Para isso foram utilizados tubos reativos da

Dragüer[R], com sensibilidade de 1 a 15ppm (cód. 6728961), ou seja, de 1,83 a 27,45 mg/m^3 (95), acoplados à bomba tipo "foley" do mesmo fornecedor.

4.2. Método

4.2.1. Preparação de suspensões de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372.

O cultivo e operações subsequentes para a obtenção dos esporos do microrganismo abrangem diferentes etapas descritas a seguir: (95)

Repiques de Manutenção

Utilizou-se 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 (Merck), em superfície inclinada, esterilizados em autoclave a vapor. Procedeu-se a incubação dos tubos inoculados à temperatura de 35 ± 2°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 37x200mm. A incubação seguiu idênticas condições do repique de manutenção.

Obtenção de Esporos

Da suspensão anterior, 5mL foram inoculados para cada garrafa de Roux contendo 200mL de ágar para esporulação, cuja composição é a seguir descrita:

Extrato de levedura	**8,00g**
Caldo nutriente	**4,00g**
Sulfato de Manganês tetrahidratado	**0,05g**
Cloreto de Cálcio hexahidratado	**0,05g**
Ágar	**30,00g**
Água destilada	**q.s.p.1000mL**

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, procedeu-se a incubação das quatro garrafas a 35°C±2°C, e, diariamente, efetuou-se remoção de massa microbiana, utilizando-se alça de platina estéril, para confecção de esfregaços e acompanhamento do grau de esporulação.

Este procedimento, envolvendo quatro garrafas de Roux, foi efetuado em seis réplicas, as quais originaram os Grupos de Suspensão de Esporos de I a VI.

Acompanhamento do Grau de Esporulação

Os esfregaços obtidos a partir da massa microbiana foram fixados e submetidos a coloração com solução saturada de verde malaquita e solução aquosa de safranina (10).

O procedimento constituiu-se em aplicar a 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, enxague com água destilada e secagem.

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

Tomou-se por procedimento recolher a suspensão de esporos das garrafas de Roux, respeitando os Grupos distintos, a partir do valor mínimo de 95% de esporulação, o que ocorreu no 12° ou 13° dia de incubação.

Recolhimento e lavagem dos esporos

A massa celular resultante do crescimento no ágar foi recolhida de cada garrafa com 30mL de água destilada estéril, com o auxílio de pérolas de vidro e passando a suspensão obtida por filtro constituído de 4 camadas de tecido de poliéster estéril. Seguiram-se sucessivas lavagens com água destilada estéril e centrifugação a 3000rpm durante 15 minutos, utilizando centrífuga marca

Fanem modelo 205N. O material centrifugado foi retomado em cerca de 40mL de água destilada estéril, e tranferido para erlenmeyer de 125mL.

Tratamento térmico

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 ± 2°C, durante 30 minutos (95). 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 da suspensão 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 125mL providos de tampa, em alíquotas de

10mL 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 aleatoreamente, 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.

O procedimento iniciou 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 profundidade "Pour Plate" (128), usando cerca de 15 mL de ágar caseína-soja estéril por placa. Após solidificação, adicionou-se superficialmente camada extra de 5mL 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 ± 2°C, durante 72 horas, seguindo-se contagem do número de UFC (unidades formadoras de colônias).

4.2.3. Preparação e inóculo dos suportes celulósicos

Os frascos 4, 5, e 6 foram inicialmente os utilizados para distribuição nos suportes, tendo sido destinados para este fim discos de papel de filtro marca Whatman^{R}, com 13mm de diâmetro, previamente esterilizados em estufa a 100°C por 4 horas.

Após descongelamento à temperatura ambiente, a transferência das suspensões de esporos aos suportes foi efetuada em capela provida de luz ultra-violeta. Os discos foram posicionados sobre tela de aço inoxidável com o auxílio de pinça estéril. Com a luz ultra-violeta desligada, as suspensões de esporos foram distribuídas, sob homogeneização frequente, com a pipeta automática na razão de 0,1mL por suporte, permitindo rendimento de aproximadamente 95 suportes por frasco. A secagem dos suportes foi acelerada introduzindo-se na capela placas contendo sílica-gel.

Seguiu-se tempo de 24 horas, após o qual os suportes foram individualmente acondicionados em suas respectivas embalagens individuais, constituídas de papel grau cirúrgico e filme poliéster-polietileno, na dimensão aproximada de 5cm x 5cm, previamente esterilizados por óxido de etileno. Procedeu-se então a termosselagem e manutenção a aproximadamente 4°C até o momento de sua utilização.

4.2.4. Contagem confirmatória da carga microbiana inoculada

Este procedimento teve como objetivo confirmar a carga de esporos depositada em cada suporte celulósico após o inóculo de 0,1mL por suporte, a partir do "pool" de esporos contendo $8,49 \times 10^9$ esporos por mL de suspensão. O resultado obtido na contagem dos suportes estará representando o valor correspondente ao "tempo zero" da série de desafios a serem desenvolvidos em tempos sub-letais, e será extrapolado para todos os suportes confeccionados para os ciclos de exposição às misturas esterilizantes, tendo em vista a uniformidadede obedecida para condições de inóculo dos mesmos.

Método de desintegração em liquidificador

Empregou-se para contagem de UFC (unidades formadoras de colônias), triplicata de monitores biológicos constituídos de suportes celulósicos inoculados e embalados, representativos de cada um dos frascos (4, 5 e 6). As embalagens dos monitores foram assepticamente abertas sob capela de fluxo laminar, onde com o auxílio de pinça estéril foram transferidos para copo de liquidificador de facas dentadas, marca Walita, modelo Delta Eletrônico. A operação foi feita em duplicata, utilizando-se de dois copos distintos previamente descontaminados com solução de glutaraldeído e posteriormente esterilizados por óxido de etileno. A desintegração dos suportes foi obtida com a trituração por 10 minutos em rotação média.

Em cada uma das contagens efetuadas, o volume de água destilada estéril empregado foi de 100mL para cada monitor. A suspensão resultante, após a trituração, foi submetida a tratamento térmico em banho-maria a 70 ± 2°C durante 15 minutos. Novas diluições decimais foram efetuadas, sendo aquelas de diluições 10^{-4} a 10^{-8} foram destinadas a contagem, em triplicata, pela técnica de semeadura em profundidade (128). A distribuição do meio de cultura nas placas e a incubação foram em condições idênticas às usadas para quantificação da suspensão inicial, anteriormente à inoculação nos suportes.

Método de desintegração em agitador vortex

O procedimento iniciou-se com a colocação de triplicata de monitores biológicos, constituídos de suportes celulósicos inoculados e embalados, representativos de cada um dos frascos (4, 5 e 6), sob capela de fluxo laminar vertical, onde as embalagens individuais foram abertas utilizando-se

procedimento asséptico. Com o auxílio de pinça e tesoura estéreis, cada unidade foi fragmentada em pedaços de cerca de 3,0mm x 2,0mm, e os fragmentos introduzidos em tubos de ensaio de 37mm x 200mm e ressuspensos em 10mL/suporte de água destilada estéril, e juntamente com cerca de 20 gramas de pérolas de vidro de diâmetro aproximado de 3,5mm. Submeteu-se o indicador biológico comercial Attest® à procedimento semelhante, em que cada unidade foi aberta e com o auxílio de pinça estéril, transferiu-se o suporte retangular impregnado com esporos para tubo de ensaio de 23mm x 200mm contendo 10mL de água destilada estéril e cerca de 5 gramas de pérolas de vidro. A desintegração dos suportes celulósicos para liberação dos esporos foi obtida utilizando-se agitador de tubos tipo vortex, marca Phoenix, modelo AP56, nº de série 5157, ao qual se imprimiu agitação na velocidade máxima por aproximadamente 20 minutos para os suportes em disco (preparação laboratorial), e 5 minutos para os suportes retangulares (comercialmente obtidos).

As suspensões resultantes foram submetidas a idênticas condições de tratamento térmico e contagem pelo método de semeadura em profundidade utilizadas para quantificação do "pool" de esporos e suportes desintegrados através de liquidificador.

4.2.5. Ciclos laboratoriais de exposição ao gases esterilizantes

A série de exposições sub-letais foi realizada no esterilizador à óxido de etileno da SERCON Ind. Com. Ap. Méd. Hosp. LTDA, modelo HS E 39/40HETO 3000, com controle automático e câmara cilíndrica horizontal de 76 litros de capacidade, 40cm de diâmetro e 60cm de profundidade.

Os parâmetros físicos tiveram como característica constante a umidade relativa de 60 a 70%, variando-se a concentração de gás em 450mg/L e 600mg/L no caso do Oxyfume 12^R. Mantiveram-se pressões negativa e positiva não alteradas (-0,75Kgf/cm^2 em ambas as concentrações, +0,56Kgf/cm^2 para 450mg/L e +0,65Kgf/cm^2 para 600mg/L) no caso do Oxyfume 2002^R, sem correções para ajuste da concentração do agente ativo, 2% menor. As temperaturas adotadas foram de 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C, e os tempos de exposição de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos respectivamente.

Foram realizados ciclos sub-letais correlacionando as temperaturas de 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C, com os dois gases em estudo, as duas concentrações e os cinco tempos de exposição, sendo que cada combinação de parâmetros foi realizada em triplicata, perfazendo um total de 180 ciclos.

Foram submetidos a cada ciclo seis monitores confeccionados laboratorialmente (três para contagem subsequente e três para eventual necessidade de reteste), perfazendo um total de 1080, e dois monitores Attest^R (um para contagem subsequente e outro para eventual necessidade de reteste), perfazendo um total de 360.

4.2.6. Acompanhamento de letalidade e resistência

A cada ciclo, após o término da exposição, aeração forçada e abertura do esterilizador, os monitores biológicos laboratoriais e comerciais foram transferidos para área de aeração ambiental, aí permanecendo por aproximadamente 24 horas. Após esse período, foram então deslocados para capela de fluxo laminar vertical, removidos de sua embalagem e os esporos foram liberados de seus respectivos suportes através de técnica de desintegração utilizando agitador vortex. Após choque térmico (70^0C, 15 min.), foi então feita a contagem de sobreviventes empregando técnica de semeadura em profundidade, a mesma empregada para contagens anteriores. Os dados destinaram-se a obtenção de curvas de letalidade e cálculo dos respectivos valores D (123, 128, 139), assim como análise estatística dos resultados.

4.2.7. Determinação do nível residual de óxido de etileno no ambiente

As medições de resíduos ambientais foram efetuadas com frequência mensal e durante o desenvolvimento dos ciclos sub-letais de 15 minutos, em momentos e posições a seguir indicados. A altura adotada para coleta de ar nas medições foi de aproximadamente 1m acima do nível do chão, exceto para a medida interna à câmara, que foi em posição central. Procedeu-se à monitoração com os exaustores ligados, contemplando as condições diárias de trabalho na Central de Esterilização. As posições e momentos monitorados foram:

- Área de depósito de cilindros – durante o ciclo, no período de introdução do gás à câmara esterilizante;

- Sala de preparo de materiais – durante o ciclo, no período de exposição ao gás;
- Sala de comando – idem ao anterior;
- Sala de aeração/armazenagem de materiais esterilizados – idem ao anterior, e simultaneamente com material aerando (período de 24 horas do ciclo anterior);
- Sala de esterilização – durante o ciclo, no período de exposição ao gás;
- Interior da câmara esterilizante – após o término do ciclo, imediatamente após a abertura da porta do esterilizador.

O recurso adotado para as medições foi do tipo ensaio-limite, empregando os tubos reativos da Dragüer^R, com faixa de medição de 1 a 15 ppm, ou seja, de 1,83 a 27,45 mg/m^3, sensibilidade de 1ppm/2000cm^3, acoplados à bomba tipo "foley" do mesmo fornecedor, à qual se imprimiram 20 bombeamentos em cada ponto, perfazendo uma amostragem de volume de ar correspondente a 2000cm^3 (95).

4.2.8. Análise Estatística

Foi efetuada análise de variância dos resultados no sentido de investigar a significância nas interações entre as variáveis estudadas.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Paralelamente ao avanço tecnológico generalizado, vivencia-se atualmente momento de alterações intensas, por vezes radicais, no âmbito da saúde. A situação predominante hoje nos hospitais envolve o uso de técnicas e instrumentais avançados, procedimentos extremamente invasivos (ao lado de técnicas laparoscópicas com caráter invasivo mínimo); depara-se com microrganismos altamente resistentes, em parte devido ao emprego abusivo da antibioticoterapia; os pacientes estão muitas vezes imunossuprimidos, seja devido a determinada patologia ou mesmo à medicação, ou ainda criticamente doentes e/ou debilitados pela faixa etária elevada.

Assim, a necessidade do emprego de processos esterilizantes que compatibilizem com materiais termossenssíveis 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 corrosibilidade, não promoção de alterações a 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 possua baixa toxicidade ao ser humano, ausência de inflamabilidade, facilidade de estocagem e pronta disponibilidade.

O óxido de etileno apresenta a maioria dessas características, entretanto seu aspecto de inflamabilidade e toxicidade impulsiona à busca por 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 seguros.

Estudos envolvendo o óxido de etileno esclareceram quanto às suas características de explosividade, evidenciando ser a fase líquida estável a agentes detonantes, mas seu vapor passível de decomposição explosiva. Quando puro irá se decompor parcialmente, mas pequena diluição com ar (de 3 a 100%) ou pequena elevação na pressão inicial promove condições ideais para completa decomposição (125). Na presença de certos catalizadores, o óxido de etileno líquido forma um poli-condensado, sendo esta reação altamente exotérmica. Se o calor de reação não for conduzido de forma a manter o equilíbrio de temperatura, um aumento na pressão acarretará um aumento na velocidade de reação, levando a condições explosivas. Para fins biológicos, entretanto, o uso de misturas com dióxido de carbono (CO_2) ou hidrocarbonetos clorofluorados (CFCs) evita riscos de explosão (44). Características físico-químicas dos CFCs têm, no geral, privilegiado seu emprego como diluente inerte, comparativamente ao CO_2, pois misturas com o último tendem a sofrer estratificação, seja no cilindro ou na câmara esterilizante; embora tais problemas sejam contornáveis com recursos mecânicos, introduzem dúvida desnecessária ao processo. Ainda esta opção, que estaria minimizando a explosividade do óxido de etileno e eliminando o uso dos CFCs, traria como desvantagens a necessidade de grandes investimentos de capital, devido a diferenciais de pressão de trabalho e/ou explosividade, em custos de engenharia e revalidações.

Entretanto, graças a intensa pesquisa de solventes alternativos, provocada pelo impacto do risco da depleção da camada de ozônio, alguns resultados foram muito interessantes. Decorreu destes estudos o desenvolvimento de mistura alternativa, já disponível comercialmente, fornecida pela White Martins sob a denominação de Oxyfume 2002^{R}, cuja composição agrega óxido de etileno, HCFC 124 e HCFC 22, nas proporções, respectivamente de, 10%, 63% e 27%, com potencial de depleção mínimo quando comparado ao CFC 12, agente inerte atualmente empregado.

Tendo sido delineado o escopo do trabalho, o estudo comparativo quanto à eficácia da ação esterilizante da mistura convencional (Oxyfume 12^R) e inovadora (Oxyfume 2002^R), definiu-se as diretrizes básicas que pudessem conduzir a bom êxito o trabalho.

Assim, uma das decisões foi desenvolver a preparação do monitor biológico em laboratório, entretanto sem deixar de trabalhar, em paralelo, com o produto obtido comercialmente. Desta forma estaria sendo priorizada a versatilidade e independência quanto à obtenção do monitor, e simultaneamente criando um mecanismo, que se pode dizer, de validação do monitor laboratorial, ao se considerar a idoneidade e tradição da empresa produtora selecionada (3M). Em contrapartida, fazer um estudo quanto à confiabilidade das informações apresentadas por este fornecedor, no aspecto quantitativo e qualitativo, que representam respectivamente, população e resistência dos esporos. Com o intuito de investigar relação entre condição esterilizante e sua efetividade, FURUHASHI E MIYAMAE (48) também utilizaram os monitores obtidos comercialmente ATTEST^R 3M, bem como monitores SPORDI^R AMSCO, os quais mostraram ser confiáveis e adequados na obtenção de dados referentes a condições de ciclos esterilizantes.

É também válido que se justifique a adoção da nomenclatura monitor, conceituada por HASTRUP (54), ao invés do termo indicador, mais comumente empregado. A resposta está na concepção de que os esporos são essencialmente um sensor, e que sempre num processo esterilizante, este sensor deverá ser submetido a desafio equivalente ao do produto, então constituindo-se em, após embalagem e eventualmente outras barreiras, realmente num monitor.

Optou-se por proceder à obtenção dos esporos em meio sólido, à revelia de certos autores que mencionam vantagens em se trabalhar com meio líquido sintético (56). Conforme PINTO e SAITO (98), o rendimento foi mais interessante com o meio complexo. O meio de cultura foi incorporado de íons

bivalentes de forma a acentuar a resistência dos esporos e o nível de esporulação (71, 118), que também foi favorecido pelo longo tempo de incubação, onde há diminuição da concentração de nutrientes (88). Assim sendo, eram de certa forma esperados os bons resultados de esporulação obtidos, com valores crescentes no decorrer do tempo, e tendo sempre atingido índice de 95% nas quatro garrafas de cada um dos seis grupos, quando no 12^0 dia. Embora o método de quantificação desse índice pudesse dar margem a erro, atendia a meta principal de assegurar a quase totalidade de esporos na massa recolhida: eventuais células vegetativas sofreriam destruição quando do primeiro choque térmico.

Eventuais variações que tenham ocorrido no meio de cultura utilizado para proporcionar multiplicação das células vegetativas, anteriormente à transferência destas para o meio de cultura específico de esporulação, não influenciaram o potencial de esporulação, conforme trabalho de KEYNAN e colaboradores (65). Estes autores empregaram meio acrescido de ácido nalidíxico, que apesar de ocasionar supressão da síntese de DNA, não impediu as células de gerarem novos sítios de replicação de DNA, o que as tornou funcionais quando de sua transferência para meio de esporulação. Isto confirma a não influência de meios que antecedam o de esporulação sobre este processo.

O resultado homogêneo obtido em todos os grupos de garrafas (tabelas de 1 a 6) estimulou que fossem, sem segregações, agregadas em um "pool", então subdividido em 25 frascos por facilidade operacional, assim como para evitar alterações bruscas de temperatura, subsequentes, em congelamentos e descongelamentos para atender as etapas seguintes do trabalho. Apesar da boa estabilidade referenciada na literatura para monitores obtidos de mesma cepa microbiana (52), estas alterações não foram incorporadas no estudo experimental desenvolvido pelos autores. Também, na forma de suspensão, a

susceptibilidade dos esporos a alterações pode ser maior que após distribuídos em suportes.

Tabela 1. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos I.

DIAS	GARRAFA 1	GARRAFA 2	GARRAFA 3	GARRAFA 4
1°	10%	10%	15%	10%
2°	30%	30%	40%	40%
3°	40%	40%	50%	50%
4°	50%	50%	60%	60%
5°	60%	60%	70%	70%
6°	60%	60%	70%	70%
7°	70%	70%	80%	80%
8°	70%	70%	80%	80%
9°	80%	80%	90%	90%
10°	85%	85%	90%	90%
11°	90%	90%	95%	95%
12°	95%	95%	95%	95%

Tabela 2. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos II.

DIAS	GARRAFA 1	GARRAFA 2	GARRAFA 3	GARRAFA 4
1°	10%	10%	10%	15%
2°	30%	30%	40%	40%
3°	50%	50%	50%	50%
4°	60%	60%	60%	60%
5°	70%	70%	70%	70%
6°	75%	75%	75%	75%
7°	80%	80%	80%	80%
8°	85%	85%	85%	80%
9°	85%	85%	85%	85%
10°	90%	90%	90%	90%
11°	90%	90%	95%	95%
12°	95%	95%	95%	95%

Tabela 3. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos III.

DIAS	GARRAFA 1	GARRAFA 2	GARRAFA 3	GARRAFA4
1°	10%	10%	10%	10%
2°	30%	30%	30%	30%
3°	40%	40%	50%	40%
4°	50%	50%	50%	50%
5°	60%	60%	60%	60%
6°	65%	65%	60%	60%
7°	70%	70%	65%	65%
8°	70%	70%	70%	70%
9°	80%	80%	80%	80%
10°	90%	90%	90%	90%
11°	90%	90%	95%	95%
12°	95%	95%	95%	95%

Tabela 4. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos IV.

DIAS	GARRAFA 1	GARRAFA 2	GARRAFA 3	GARRAFA 4
1°	10%	10%	10%	10%
2°	30%	30%	30%	30%
3°	50%	50%	50%	50%
4°	60%	60%	60%	60%
5°	70%	70%	70%	70%
6°	75%	70%	70%	75%
7°	75%	75%	75%	75%
8°	80%	80%	80%	80%
9°	85%	85%	85%	90%
10°	90%	90%	90%	90%
11°	90%	90%	90%	90%
12°	95%	95%	95%	95%

Tabela 5. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos V.

DIAS	GARRAFA 1	GARRAFA 2	GARRAFA 3	GARRAFA 4
1°	10%	10%	15%	15%
2°	30%	30%	30%	30%
3°	50%	50%	40%	40%
4°	50%	50%	50%	50%
5°	60%	60%	60%	60%
6°	60%	60%	60%	60%
7°	70%	70%	70%	70%
8°	80%	70%	70%	80%
9°	80%	80%	80%	80%
10°	85%	80%	80%	85%
11°	90%	90%	90%	90%
12°	95%	95%	95%	95%

Tabela 6. Resultados percentuais de esporulação obtidos para o Grupo de Suspensão de Esporos VI.

DIAS	GARRAFA 1	GARRAFA 2	GARRAFA 3	GARRAFA 4
1°	10%	10%	10%	10%
2°	30%	30%	30%	30%
3°	40%	40%	50%	40%
4°	50%	50%	50%	50%
5°	60%	60%	60%	60%
6°	60%	60%	60%	60%
7°	70%	70%	70%	75%
8°	80%	80%	75%	80%
9°	80%	80%	80%	80%
10°	90%	90%	85%	90%
11°	90%	90%	90%	90%
12°	95%	95%	95%	95%

O valor médio representativo do número de esporos no "pool" foi de 8,49 x 10^9 UFC/mL(Tabela 7). Pode-se imaginar que na ausência de falhas técnicas na transferência de 0,1mL da suspensão homogênea de esporos para discos de papel de filtro, com pipeta automática previamente calibrada e em condições assépticas, deveria ocorrer apenas uma redução de cerca de 10 vezes na contagem. Assim, podem ser a princípio considerados satisfatórios e isentos de qualquer suspeita os resultados inicialmente obtidos na desintegração dos suportes em liquidificador, com duplicata de contagem independente (copos 1 e 2), precedidas de choque térmico para ativação dos esporos, respectivamente de 5,87 x 10^8 UFC/suporte (Tabela 8), e 6,83 x 10^8 UFC/suporte (Tabela 9).

Tabela 7. Resultado da contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, em UFC/mL, obtido dos frascos 1, 2 e 3 e representativos para o "pool" de esporos.

Frasco - "pool"	**Fator de Diluição**			**Contagem Média UFC/mL**
	10^7	10^8	10^9	
FRASCO 1	398	134	13	$10,12 \times 10^9$
	736	92	12	$9,52 \times 10^9$
	584	126	5	$9,01 \times 10^9$
FRASCO 2	392	100	7	$6,97 \times 10^9$
	168	72	9	$5,96 \times 10^9$
	696	92	10	$10,03 \times 10^9$
FRASCO 3	400	115	8	$7,83 \times 10^9$
	1112	126	10	$11,24 \times 10^9$
	1092	71	8	$8,67 \times 10^9$
"POOL"	619	103	9	$8,49 \times 10^9$

Tabela 8. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, veiculados pelos suportes inoculados, após desintegração em liquidificador, Copo 1.

Frasco	**Suporte**	**Fator de Diluição**			**Contagem Média UFC/suporte**
		10^6	10^7	10^8	
4	1	180	49	3	$3,23 \times 10^8$
	2	260	46	5	$4,06 \times 10^8$
	3	564	53	5	$5,31 \times 10^8$
5	1	288	67	3	$4,19 \times 10^8$
	2	290	55	5	$4,46 \times 10^8$
	3	616	59	6	$6,02 \times 10^8$
6	1	608	117	10	$9,26 \times 10^8$
	2	768	84	11	$9,02 \times 10^8$
	3	680	90	9	$8,26 \times 10^8$
MÉDIA		472	69	6	$5,87 \times 10^8$

Tabela 9. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, veiculados pelos suportes inoculados, após desintegração em liquidificador, Copo 2.

Frasco	**Suporte**	**Fator de diluição**			**Contagem Média UFC/suporte**
		10^6	10^7	10^8	
4	1	240	56	13	$7,00 \times 10^8$
	2	264	59	8	$5,51 \times 10^8$
	3	200	65	10	$6,16 \times 10^8$
5	1	528	63	7	$5,52 \times 10^8$
	2	396	71	7	$6,02 \times 10^8$
	3	201	50	6	$4,33 \times 10^8$
6	1	856	86	12	$9,72 \times 10^8$
	2	840	101	8	$8,83 \times 10^8$
	3	520	80	11	$8,06 \times 10^8$
MÉDIA		449	70	9	$6,83 \times 10^8$

Suspeitou-se, entretanto, de eventual possibilidade de resíduo de glutaraldeído, devido à sua característica de aderência, apesar de enxagües cuidadosos, adotando-se então, para outros três frascos, também tomados aleatoreamente, procedimento de desintegração em agitador do tipo vortex, com o recurso adicional de pérolas de vidro. O procedimento mostrou-se mais prático, e certamente apresenta a vantagem adicional de isenção de qualquer resíduo com ação inibitória sobre o desenvolvimento microbiano. Outro aspecto que pode ter contribuído no sentido da melhoria de resultados com o segundo procedimento (vortex) consiste na redução de dez vezes no volume de diluente empregado, aspecto interessante na minimização de erro analítico. Os valores obtidos foram efetivamente maiores, da ordem de $1,17 \times 10^9$ UFC/suporte (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, veiculados pelos suportes celulósicos em disco inoculados, após desintegração em tubos de ensaio sob agitação em vortex.

Frasco	**Suporte**	**Fator de diluição**		**Contagem**
		10^7	10^8	**Média UFC/suporte**
4	1	128	16	$1,44 \times 10^9$
	2	130	12	$1,25 \times 10^9$
	3	120	12	$1,20 \times 10^9$
5	1	113	13	$1,21 \times 10^9$
	2	117	16	$1,38 \times 10^9$
	3	120	11	$1,15 \times 10^9$
6	1	98	12	$1,09 \times 10^9$
	2	102	11	$1,06 \times 10^9$
	3	103	10	$1,01 \times 10^9$
MÉDIA		114	12	$1,17 \times 10^9$

A justificativa para a redução de cerca de dez vezes, quanto à média obtida das suspensões, é certamente a presença de grumos de esporos na mesma, impedindo que cada unidade (esporo) fosse traduzida em UFC (unidade formadora de colônia).

A contagem do número de esporos presentes nos suportes retangulares contidos nos monitores biológicos Attest^R, produzidos pela 3M, lote 172, foi empregando a desintegração em agitador tipo vortex, e forneceu como valor médio das três contagens independentes 3,84 x 10^6 UFC/suporte (Tabela 11). O valor nominal apresentado pelo produtor é de 4,12 x 10^6 UFC/suporte : considerando o erro implícito na técnica de contagem, permite-se concluir pela confiabilidade no dado fornecido, configurando também como respaldo à técnica adotada.

Tabela 11. Valores de contagem de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 dos monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, veiculados em suportes celulósicos retangulares após desintegração em tubos de ensaio sob agitação em vortex.

Lote	**Suporte**	**Fator de diluição**		**Contagem Média UFC/suporte**
		10^4	10^5	
	1	414	38	$3,97 \times 10^6$
172	2	358	35	$3,54 \times 10^6$
	3	363	45	$4,06 \times 10^6$
MÉDIA		378	39	$3,84 \times 10^6$

Tendo sido quantitativamente padronizados os monitores, passou-se a proceder ao desafio dos mesmos, em triplicata de ciclo para cada uma das condições, respeitando as concentrações de gás de 600mg/L e 450mg/L, sendo que a temperatura foi mantida constante à 45^{0}C na primeira série de 60 ciclos para as duas misturas esterilizantes, Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R. A segunda série de 60 ciclos, realizada à 55^{0}C, respeitou as mesmas condições mencionadas anteriormente, assim como também a última série de 60 ciclos, realizada à 65^{0}C. Os tempos sub-letais adotados foram de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos, em decorrência de resultados com reduzida sensibilidade ao se

trabalhar inicialmente com os tempos de 2, 3, 4 e 5 minutos, anteriormente propostos. A sequência de desafios adotada respeitou um mínimo de cinco tempos, conforme orientado pelas normas vigentes ISO (International Standard Organization) (115) e AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation (5).

Adotando sempre a técnica de desintegração dos suportes e liberação dos esporos com agitador tipo vortex, assim como choque térmico para sua ativação, procedeu-se às contagens, que levaram à construção das Tabelas 12 a 23, para os monitores de preparação laboratorial, e Tabelas 24 a 35 para os monitores comercialmente obtidos Attest^{R}. Embora não expresso nestas tabelas, o valor de contagem correspondente ao tempo zero (monitores não submetidos ao desafio com qualquer das misturas esterilizantes) foram aqueles anteriormente mencionados como contagem (valor médio) dos monitores de obtenção laboratorial (1,17 x 10^9 UFC/suporte, conforme Tabela 10) e comercial (4,12 x 10^6 UFC/suporte, conforme Tabela 11), valor nominal expresso pelo fabricante e experimentalmente confirmado.

Tabela 12. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600 mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,03 \times 10^7$	$1,66 \times 10^6$	$1,67 \times 10^5$	$3,82 \times 10^4$	$1,70 \times 10^3$
2	$1,04 \times 10^7$	$1,26 \times 10^6$	$3,89 \times 10^5$	$1,27 \times 10^4$	$1,20 \times 10^3$
3	$1,13 \times 10^7$	$1,39 \times 10^6$	$2,28 \times 10^5$	$4,00 \times 10^4$	$2,27 \times 10^3$

Tabela 13. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,37 \times 10^7$	$1,07 \times 10^6$	$7,18 \times 10^5$	$1,65 \times 10^4$	$1,70 \times 10^2$
2	$3,57 \times 10^7$	$2,82 \times 10^6$	$1,06 \times 10^6$	$1,63 \times 10^4$	$1,90 \times 10^2$
3	$2,83 \times 10^7$	$1,70 \times 10^6$	$3,53 \times 10^5$	$1,71 \times 10^4$	$3,10 \times 10^2$

Tabela 14. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$2,09 \times 10^8$	$7,54 \times 10^6$	$7,95 \times 10^5$	$2,83 \times 10^4$	$6,40 \times 10^3$
2	$4,39 \times 10^7$	$5,81 \times 10^6$	$3,63 \times 10^5$	$3,11 \times 10^4$	$7,70 \times 10^3$
3	$3,32 \times 10^7$	$1,22 \times 10^6$	$7,46 \times 10^5$	$3,20 \times 10^4$	$8,20 \times 10^3$

Tabela 15. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,19 \times 10^8$	$1,08 \times 10^7$	$3,44 \times 10^4$	$8,21 \times 10^3$	$7,10 \times 105^2$
2	$5,49 \times 10^7$	$5,57 \times 10^6$	$2,73 \times 10^4$	$2,33 \times 10^3$	$7,45 \times 10^2$
3	$2,32 \times 10^7$	$5,76 \times 10^6$	$3,68 \times 10^4$	$6,32 \times 10^3$	$3,70 \times 10^2$

Tabela 16. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,90 \times 10^6$	$1,09 \times 10^5$	$2,20 \times 10^4$	$1,60 \times 10^3$	$1,70 \times 10^2$
2	$9,30 \times 10^5$	$2,01 \times 10^5$	$4,60 \times 10^3$	$3,20 \times 10^2$	$1,50 \times 10$
3	$3,41 \times 10^6$	$6,67 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$1,30 \times 10^3$	$1,35 \times 10^2$

Tabela 17. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,78 \times 10^7$	$6,33 \times 10^6$	$7,81 \times 10^5$	$6,70 \times 10^4$	$2,30 \times 10^3$
2	$3,94 \times 10^6$	$2,90 \times 10^5$	$1,65 \times 10^4$	$6,00 \times 10^3$	$3,71 \times 10^2$
3	$2,36 \times 10^7$	$1,67 \times 10^6$	$2,26 \times 10^5$	$9,40 \times 10^4$	$3,00 \times 10^3$

Tabela 18. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$3,71 \times 10^5$	$1,95 \times 10^4$	$1,19 \times 10^3$	$4,87 \times 10^2$	$3,79 \times 10$
2	$3,57 \times 10^6$	$1,77 \times 10^5$	$7,71 \times 10^4$	$4,07 \times 10^3$	$8,50 \times 10^2$
3	$1,97 \times 10^6$	$1,29 \times 10^5$	$6,61 \times 10^4$	$4,05 \times 10^3$	$3,00 \times 10^2$

Tabela 19. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$4,77 \times 10^6$	$1,14 \times 10^5$	$6,06 \times 10^4$	$5,17 \times 10^3$	$2,71 \times 10^2$
2	$1,52 \times 10^7$	$8,96 \times 10^6$	$5,72 \times 10^5$	$4,34 \times 10^4$	$1,98 \times 10^3$
3	$1,36 \times 10^7$	$6,44 \times 10^6$	$5,42 \times 10^5$	$4,16 \times 10^4$	$3,20 \times 10^3$

Tabela 20. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$3,16 \times 10^3$	$4,53 \times 10^2$	$4,07 \times 10$	zero	zero
2	$6,33 \times 10^3$	$3,77 \times 10^2$	$1,13 \times 10$	zero	zero
3	$4,54 \times 10^3$	$2,10 \times 10^2$	$3,13 \times 10$	$1,03 \times 10$	zero

Tabela 21. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,55 \times 10^4$	$2,82 \times 10^3$	$2,50 \times 10^2$	$1,93 \times 10$	zero
2	$3,29 \times 10^4$	$8,55 \times 10^3$	$3,29 \times 10^2$	$1,38 \times 10$	zero
3	$1,90 \times 10^4$	$2,58 \times 10^3$	$1,27 \times 10^2$	$1,00 \times 10$	zero

Tabela 22. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,24 \times 10^4$	$2,67 \times 10^3$	$5,79 \times 10^2$	$1,61 \times 10$	zero
2	$5,76 \times 10^3$	$1,86 \times 10^3$	$9,00 \times 10$	$1,34 \times 10$	zero
3	$2,59 \times 10^3$	$1,05 \times 10^3$	$5,14 \times 10^2$	$2,56 \times 10$	zero

Tabela 23. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos obtidos laboratorialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$8,58 \times 10^3$	$3,28 \times 10^3$	$2,92 \times 10^2$	$3,41 \times 10$	zero
2	$3,30 \times 10^4$	$6,27 \times 10^3$	$4,87 \times 10^3$	$2,88 \times 10^2$	$4,84 \times 10$
3	$3,74 \times 10^3$	$1,35 \times 10^3$	$5,87 \times 10^2$	$4,04 \times 10$	zero

Tabela 24. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$4,78 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$2,13 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	$2,40 \times 10^2$
2	$1,74 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	$1,98 \times 10^4$	$1,35 \times 10^3$	$3,90 \times 10^2$
3	$1,76 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$	$1,83 \times 10^4$	$1,19 \times 10^3$	$3,35 \times 10^2$

Tabela 25. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,07 \times 10^6$	$2,70 \times 10^5$	$8,65 \times 10^4$	$3,02 \times 10^3$	$1,30 \times 10$
2	$5,03 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$7,94 \times 10^4$	$2,88 \times 10^3$	$1,60 \times 10$
3	$3,47 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	$5,76 \times 10^4$	$2,97 \times 10^3$	$1,60 \times 10$

Tabela 26. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,46 \times 10^6$	$1,73 \times 10^5$	$1,92 \times 10^4$	$7,42 \times 10^3$	$2,60 \times 10^2$
2	$8,54 \times 10^5$	$1,37 \times 10^5$	$1,90 \times 10^4$	$1,83 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$
3	$3,42 \times 10^5$	$9,29 \times 10^4$	$1,72 \times 10^4$	$3,48 \times 10^3$	$3,20 \times 10^2$

Tabela 27. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 45°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,10 \times 10^6$	$4,57 \times 10^5$	$1,79 \times 10^4$	$3,27 \times 10^3$	$5,70 \times 10^2$
2	$9,09 \times 10^5$	$2,94 \times 10^5$	$8,81 \times 10^3$	$1,78 \times 10^3$	$4,10 \times 10^2$
3	$1,18 \times 10^6$	$4,19 \times 10^5$	$5,84 \times 10^3$	$2,83 \times 10^3$	$4,10 \times 10^2$

Tabela 28. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$3,58 \times 10^4$	$1,83 \times 10^3$	$1,95 \times 10^2$	$1,75 \times 10$	zero
2	$1,39 \times 10^4$	$1,09 \times 10^3$	$2,30 \times 10$	$1,02 \times 10$	zero
3	$2,60 \times 10^3$	$4,40 \times 10^2$	$1,33 \times 10$	zero	zero

Tabela 29. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$3,97 \times 10^5$	$6,42 \times 10^3$	$3,10 \times 10^2$	$1,30 \times 10$	zero
2	$3,00 \times 10^5$	$1,97 \times 10^3$	$4,30 \times 10$	$3,20 \times 10$	zero
3	$6,70 \times 10^4$	$5,60 \times 10^2$	$1,30 \times 10$	zero	zero

Tabela 30. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$6,79 \times 10^4$	$3,05 \times 10^2$	$1,05 \times 10^2$	$5,30 \times 10$	$1,0 \times 10$
2	$3,73 \times 10^3$	$2,10 \times 10^2$	$8,30 \times 10$	$1,66 \times 10$	zero
3	$5,31 \times 10^3$	$1,65 \times 10^2$	$6,00 \times 10$	$1,0 \times 10$	zero

Tabela 31. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 55°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$4,62 \times 10^3$	$2,12 \times 10^3$	$3,75 \times 10^2$	$2,85 \times 10^2$	$3,60 \times 10$
2	$3,35 \times 10^3$	$5,60 \times 10^2$	$3,60 \times 10^2$	$2,50 \times 10^2$	$1,60 \times 10$
3	$2,86 \times 10^3$	$3,95 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$4,30 \times 10$	Zero

Tabela 32. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$7,30 \times 10^2$	$6,30 \times 10$	$3,30 \times 10$	zero	zero
2	$3,40 \times 10^2$	$6,60 \times 10$	$5,80 \times 10$	zero	zero
3	$9,00 \times 10^2$	$3,20 \times 10^2$	$4,40 \times 10$	zero	zero

Tabela 33. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 12^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$9,60 \times 10^2$	$2,30 \times 10^2$	$7,25 \times 10$	$1,05 \times 10$	zero
2	$5,53 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	$2,15 \times 10$	$1,00 \times 10$	zero
3	$9,30 \times 10^2$	$1,76 \times 10^2$	$2,00 \times 10$	zero	zero

Tabela 34. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 600mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$1,05 \times 10^3$	$6,70 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$	$2,95 \times 10$	zero
2	$1,15 \times 10^3$	$1,20 \times 10^2$	$2,85 \times 10$	$1,95 \times 10$	zero
3	$7,75 \times 10^2$	$4,15 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$	$8,30 \times 10$	zero

Tabela 35. Contagem de esporos sobreviventes (UFC/suporte) provenientes de monitores biológicos Attest^R (cód. 1264) da 3M, obtidos comercialmente, após exposição a ciclos sub-letais executados com Oxyfume 2002^R em concentração de 450mg/L, na temperatura de 65°C e durante tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 minutos.

	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)				
Réplica de ciclo	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**
1	$8,50 \times 10^3$	$3,35 \times 10^2$	$4,90 \times 10$	$3,60 \times 10$	zero
2	$3,30 \times 10^3$	$4,15 \times 10^2$	$8,60 \times 10$	$6,60 \times 10$	$1,03 \times 10$
3	$2,80 \times 10^3$	$1,15 \times 10^2$	$7,00 \times 10$	$2,00 \times 10$	zero

Apresenta-se na Tabela 36, os valores de contagem de esporos após diferentes tempos de desafio, para as diferentes misturas (Oxyfume 12^{R} e Oxyfume 2002^{R}), concentrações (600mg/L e 450mg/L) e preparações (laboratorial e comercial), assim como seus respectivos logaritmos decimais das médias do número de sobreviventes.

Tabela 36. Valores de contagem de esporos sobreviventes e seus respectivos logaritmos em base10, após diferentes tempos de exposição com as misturas Oxyfume 12[R] e Oxyfume 2002[R], concentrações de 600mg/L e 450mg/L, em preparações laboratorial e comercial de monitores biológicos, à temperaturas de 45°C, 55°C e 65°C.

T °C	Ori Gem	Oxy fume[R]	Conc mg/L	Tempo (minutos) 0 Sobrev	0 Log	3 Sobrev	3 Log	6 Sobrev	6 Log	9 Sobrev	9 Log	12 Sobrev	12 Log	15 Sobrev	15 Log
45	Lab	12	600	1,17 E+09	9,07	1,067 E+07	7,03	1,437 E+06	6,16	2,613 E+05	5,42	3,030 E+04	4,48	1,723 E+03	3,24
	Lab	12	450	1,17 E+09	9,07	2,590 E+07	7,41	1,863 E+06	6,27	7,103 E+05	5,85	1,663 E+04	4,22	2,233 E+02	2,35
	Lab	2002	600	1,17 E+09	9,07	9,537 E+07	7,98	4,857 E+06	6,69	6,346 E+05	5,80	3,046 E+04	4,48	7,433 E+03	3,87
	Lab	2002	450	1,17 E+09	9,07	6,570 E+07	7,82	7,377 E+06	6,87	3,283 E+04	4,52	5,620 E+03	3,75	6,083 E+02	2,78
55	Lab	12	600	1,17 E+09	9,07	2,080 E+06	6,32	1,256 E+05	5,10	1,220 E+04	4,09	1,073 E+03	3,03	1,067 E+02	2,03
	Lab	12	450	1,17 E+09	9,07	1,511 E+07	7,18	2,763 E+06	6,44	3,411 E+05	5,53	5,566 E+04	4,75	1,890 E+03	3,28
	Lab	2002	600	1,17 E+09	9,07	1,859 E+06	6,27	1,085 E+05	5,04	4,813 E+04	4,68	2,869 E+03	3,46	3,960 E+02	2,60
	Lab	2002	450	1,17 E+09	9,07	1,119 E+07	7,05	5,171 E+06	6,71	3,915 E+05	5,59	3,005 E+04	4,48	1,817 E+03	3,26
65	Lab	12	600	1,17 E+09	9,07	4,677 E+03	3,67	3,467 E+02	2,54	2,780 E+01	1,44	3,400 E+00	0,54	0,0	0,00
	Lab	12	450	1,17 E+09	9,07	2,247 E+04	4,35	4,650 E+03	3,67	2,353 E+02	2,37	1,440 E+01	1,16	0,0	0,00
	Lab	2002	600	1,17 E+09	9,07	6,917 E+03	3,84	1,860 E+03	3,27	3,943 E+02	2,60	1,840 E+01	1,26	0,0	0,00
	Lab	2002	450	1,17 E+09	9,07	1,511 E+04	4,18	3,633 E+03	3,56	1,916 E+03	3,28	1,208 E+02	2,08	1,610 E+01	1,21
45	Com	12	600	4,12 E+06	6,61	2,760 E+05	5,44	1,070 E+05	5,03	1,980 E+04	4,30	1,180 E+03	3,07	3,217 E+02	2,51
	Com	12	450	4,12 E+06	6,61	6,400 E+05	5,81	1,760 E+05	5,25	7,450 E+04	4,87	2,956 E+03	3,47	1,500 E+01	1,18
	Com	2002	600	4,12 E+06	6,61	8,853 E+05	5,95	1,343 E+05	5,13	1,846 E+04	4,27	4,243 E+03	3,63	2600 E+02	2,41
	Com	2002	450	4,12 E+06	6,61	1,063 E+06	6,03	3,900 E+05	5,59	1,085 E+04	4,04	2,626 E+03	3,42	4,633 E+02	2,67
55	Com	12	600	4,12 E+06	6,61	1,743 E+04	4,24	1,120 E+03	3,05	1,461 E+02	2,16	9,200 E+00	0,97	0,0	0,00
	Com	12	450	4,12 E+06	6,61	2,547 E+05	5,41	2,983 E+03	3,47	1,220 E+02	2,09	1,500 E+01	1,18	0,0	0,00
	Com	2002	600	4,12 E+06	6,61	5,277 E+03	3,72	2,267 E+02	2,36	8,270 E+01	1,92	2,650 E+01	1,42	3,300 E+00	0,52
	Com	2002	450	4,12 E+06	6,61	3,610 E+03	3,56	1,025 E+03	3,01	3,450 E+02	2,54	1,927 E+02	2,28	1,730 E+01	1,24
65	Com	12	600	4,12 E+06	6,61	6,567 E+02	2,82	1,497 E+02	2,18	4,500 E+01	1,65	0.0	0,00	0,0	0,00
	Com	12	450	4,12 E+06	6,61	8,143 E+02	2,91	1,937 E+02	2,29	3,800 E+01	1,58	6,800 E+00	0,83	0,0	0,00
	Com	2002	600	4,12 E+06	6,61	9,917 E+02	3,00	4,017 E+02	2,60	1,328 E+02	2,12	2,930 E+02	2,47	0,0	0,00
	Com	2002	450	4,12 E+06	6,61	4,867 E+03	3,69	2,883 E+02	2,46	6,830 E+01	1,83	4,070 E+01	1,61	3,400 E+00	0,54

Lab = Laboratorial / Com = Comercial
Conc = Concentração / Log = Logarítmo
Sobrev = Sobreviventes / Temp = Temperatura
E+0x(sendo x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9)= simbologia indicativa de exponencial de potência x (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9).

Por sua vez, na Tabela 37, são apresentados os valores calculados do coeficiente angular (b) e os tempos de redução decimal D, em minutos, atribuídos a cada combinação de concentração gasosa (600mg/L e 450mg/L), tipo de mistura (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R) e tipo de preparação (laboratorial e comercial), às temperaturas de 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C. Observando-se os valores D obtidos para todas as combinações, nota-se diferença entre os tempos de redução para os monitores comerciais Attest^R 3M e os monitores laboratoriais. Nos ciclos realizados à temperatura de 45^{0}C, os valores D dos monitores comerciais foram maiores que para os laboratoriais, ou seja, os monitores comerciais mostraram-se aparentemente mais resistentes que os laboratoriais (Tabela 37), sendo os valores médios comparativos de 3,496min. (comercial) e 2,575min. (laboratorial). Esta tendência, quando à temperatura de 55^{0}C, praticamente se anula, fornecendo valores médios de 2,693min. (comercial) e 2,607min. (laboratorial), ainda que mantendo maior resistência para os monitores comerciais. Entretanto, novamente é verificada a maior resistência acentuada dos monitores comerciais quando procedendo os experimentos a 65^{0}C, nos quais se obtiveram valores médios D 2,731min. (comercial) e 1,997min. (laboratorial). Há que se questionar, primeiramente, o aspecto de eliminação cuidadosa de resíduos de meio de cultura no caso das preparações laboratoriais, que pode ter ocasionado mais prontamente a exposição dos esporos ao agente antimicrobiano, levando à sua menor resistência. Podem haver também questões envolvendo a modificação na variedade da cepa empregada, sendo eventualmente mais resistente aquela dos monitores comerciais Attest^R 3M. De outro lado, ao se considerar individualmente as temperaturas, as elevações subsequentes de 10^{0}C (45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C) levaram a decaimento, para os monitores comerciais, de 3,496min. a 2,692min. e a 2,731min. , enquanto que para os monitores laboratoriais, o decaimento foi de 2,575min. a 2,607min. e a 1,997min.

Após preparados, os monitores biológicos obtidos em laboratório foram estocados sob as mesmas condições que os de aquisição comercial. Entretanto, considera-se que condições de estocagem no fornecedor, bem como transporte precedendo seu emprego podem também ter influenciado a resistência dos esporos dos monitores biológicos de origem norte-americana, adquiridos de distribuidor local.

Considerando ainda aspectos de influência na resistência dos monitores biológicos obtidos laboratorialmente, não se pode deixar de questionar a variabilidade na resistência ocasionada pelo tipo de suporte empregado, proporcionando mais prontamente ou não a exposição dos esporos do monitor biológico ao agente anti-microbiano. O tipo de suporte empregado na confecção dos indicadores biológicos laboratoriais, apesar de ser constituído de material celulósico, igualmente aos comerciais, possuia espessura e gramatura diferenciadas, sendo a malha distribuída mais frouxamente, o que pode ter levado a contato mais amplo dos esporos do indicador biológico laboratorial com o agente esterilizante.

Semelhante influência foi verificada em outros materiais empregados como suportes para os esporos do monitor biológico, entre eles o papel alumínio, material polimérico e material celulósico, os quais influenciaram diretamente a resistência dos mesmos, assim como se constituiu em fator de influência a conformação dos suportes. PINTO e CRUZ (97) procederam ao inóculo de esporos em dois tipos de suportes (material celulósico e polimérico) com quatro diferentes conformações (tira de papel, torneira três vias, seringas e catéteres). Os valores D obtidos evidenciaram equivalência de letalidade entre os suportes tira de papel, torneira três vias e seringa, enquanto que a resistência dos esporos inoculados nos catéteres foi maior devido à dificuldade de acesso do agente esterilizante.

Trabalho de mesma natureza foi realizado por PINTO e SAITO (99), onde além de material celulósico, foram utilizados alumínio e plástico como

suportes para o inóculo dos esporos. Os valores D obtidos, respectivamente 4,370min. , 6,143min. e 12,300min. evidenciam semelhante variação na resistência dos esporos ao agente esterilizante quando inoculados em diferentes materiais.

Ainda seguindo esta linha, SHINTANI (115) introduziu fibras de algodão como suporte para os esporos, além de tiras de material celulósico. Os esporos foram suspensos em dois diferentes meios líquidos, água destilada e solução salina, sendo que foram obtidos valores D diferenciados para cada combinação, tendo sido maior a resistência dos esporos inoculados em fibras de algodão e suspensos em solução salina. Esta distinção foi devida aos cristais de cloreto de sódio (NaCl) e às fibras que dificultaram o contato dos esporos com o agente esterilizante. O autor considera que variações na resistência não são devidas somente a um fator isolado, e sim à combinação de várias influências.

Tabela 37. Valores de coeficiente angular (b) da reta de regressão e o tempo de redução decimal (D) em minutos, para as combinações de parâmetros citados na Tabela 36, às temperaturas de 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C.

Origem	Gás Oxyfume^R	Temperatura (^{0}C)	Concentração (mg/L)	Coeficiente angular (b)	Valor (D) (minutos)	Valor (D) Média
Laboratorial	12	45	600	-0,358	2,797	**2,575**
			450	-0,415	2,408	
	2002		600	-0,356	2,811	
			450	-0,438	2,284	
	12	55	600	-0,439	2,279	**2,607**
			450	-0,354	2,825	
	2002		600	-0,392	2,552	
			450	-0,361	2,772	
	12	65	600	-0,532	1,880	**1,997**
			450	-0,535	1,868	
	2002		600	-0,512	1,954	
			450	-0,437	2,289	
Comercial	12	45	600	-0,270	3,700	**3,496**
			450	-0,329	3,037	
	2002		600	-0,274	3,643	
			450	-0,277	3,605	
	12	55	600	-0,417	2,398	**2,693**
			450	-0,449	2,227	
	2002		600	-0,360	2,779	
			450	-0,297	3,368	
	12	65	600	-0,400	2,497	**2,731**
			450	-0,381	2,624	
	2002		600	-0,335	2,988	
			450	-0,355	2,818	

De qualquer forma, pode-se dizer que, nos dois tipos de preparações, é indiscutível a redução do valor D com a elevação da temperatura (94), sendo entretanto fundamental que se considere, nos processos esterilizantes, fatores de segurança que eliminem efeitos decorrentes de erros experimentais. Situação semelhante foi constatada por FURUHASHI e MIYAMAE (48) através de experimentos realizados com monitores ATTEST^R 3M, e SPORDI^R AMSCO, para os quais foram encontrados valores D médios de 7,5min. (400mg/L), 7,5min. (500mg/L), 7,0min. (600mg/L) e 6,0min. (800mg/L) à temperatura de 40^{0}C; paralelamente, os valores D encontrados à temperatura de 55^{0}C foram efetivamente menores (7,0min.-400mg/L, 5,0min.-500mg/L, 5,0min.-600mg/L e 4,0min.-800mg/L), evidenciando que o aumento de 15^{0}C na temperatura acarretou uma diminuição dos valores D, ou seja, maior letalidade dos monitores biológicos estudados.

Os resultados de contagem obtidos dos esporos para preparações laboratorial e comercial, sobreviventes aos desafios frente às duas misturas esterilizantes, em diferentes concentrações, temperaturas e tempos de exposição, possibilitaram a construção das Figuras de 1 a 24, nas quais se visualizam as transformações logarítimicas dos valores experimentais de contagem (logN) nos tempos de zero a 15 minutos (em azul), assim como a reta de melhor ajuste, representando a curva de letalidade (em preto). Estão, em cada situação, apresentados a equação da reta, os valores ao quadrado do coeficiente de correlação, assim como o valor D correspondente. Em todos os casos os testes resultaram altamente significantes, indicando que a letalidade ocorre linearmente ao longo do tempo e evidenciando o aumento da letalidade dos esporos microbianos com o aumento do tempo de exposição e da temperatura, situação também confirmada em trabalho desenvolvido somente com monitores biológicos comerciais ATTEST^R, da 3M, e SPORDI^R, da AMSCO (48).

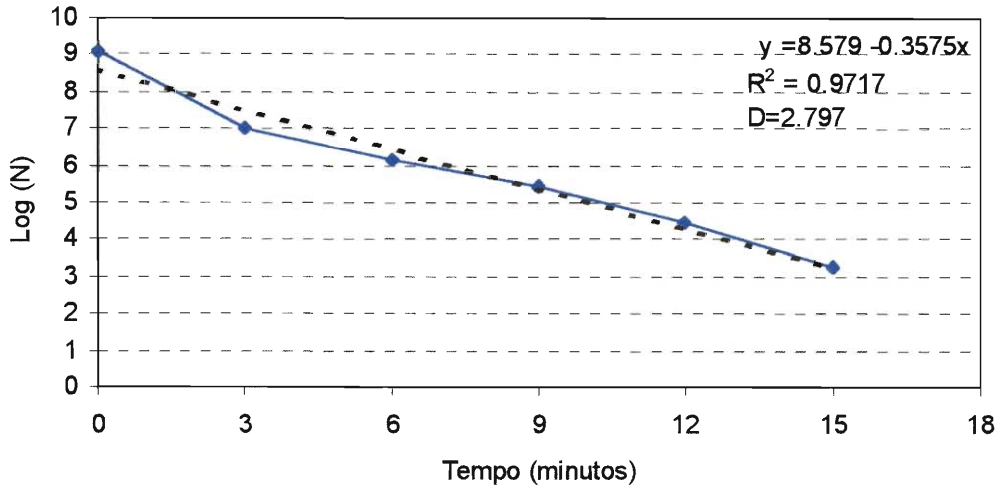

Figura 1. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 45^0C.

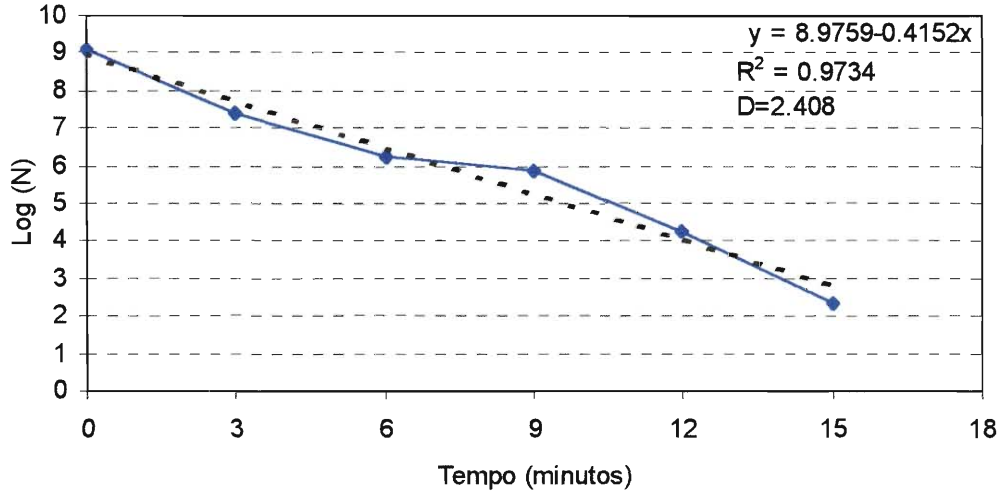

Figura 2. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 45^0C.

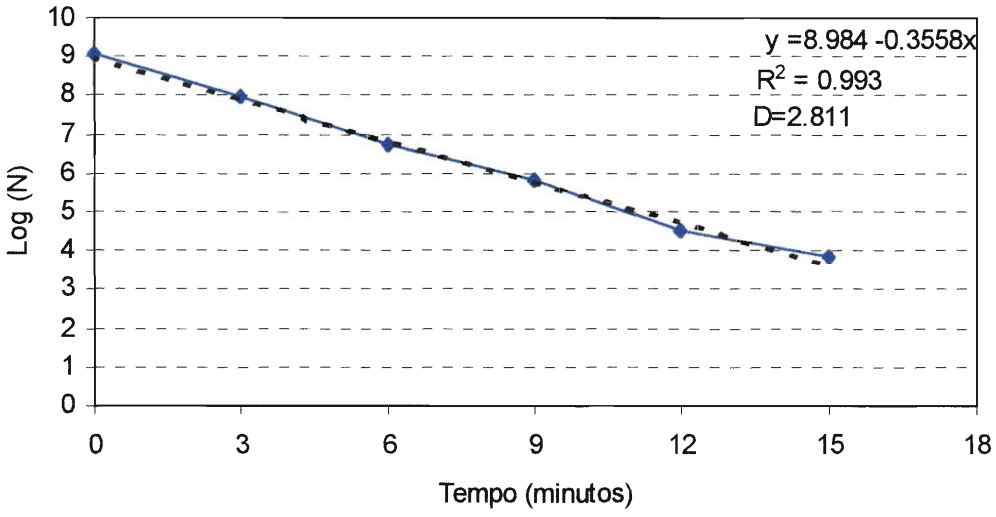

Figura 3. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposicões com Oxyfume 2002^{R}, a 600mg/L, 45^{0}C.

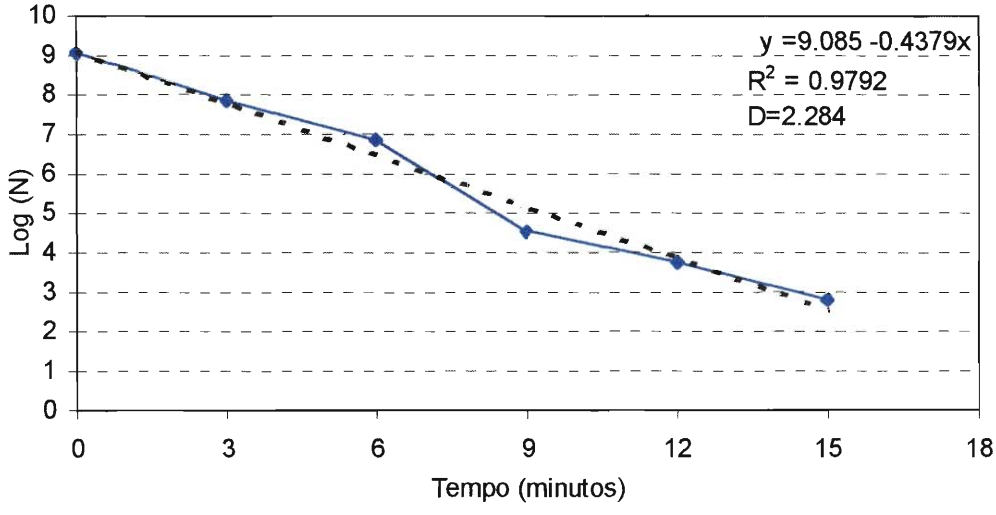

Figura 4. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 2002^{R}, a 450mg/L, 45^{0}C.

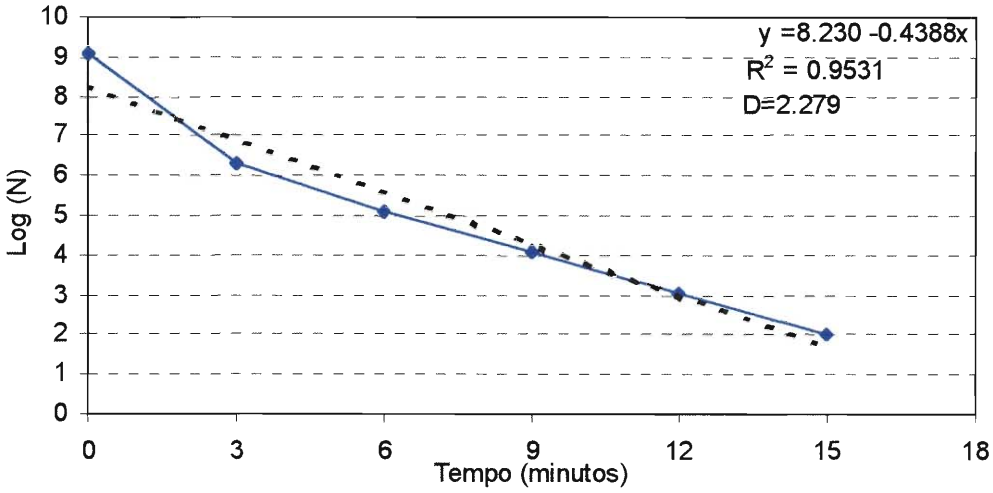

Figura 5. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^{R}, a 600mg/L, 55^{0}C.

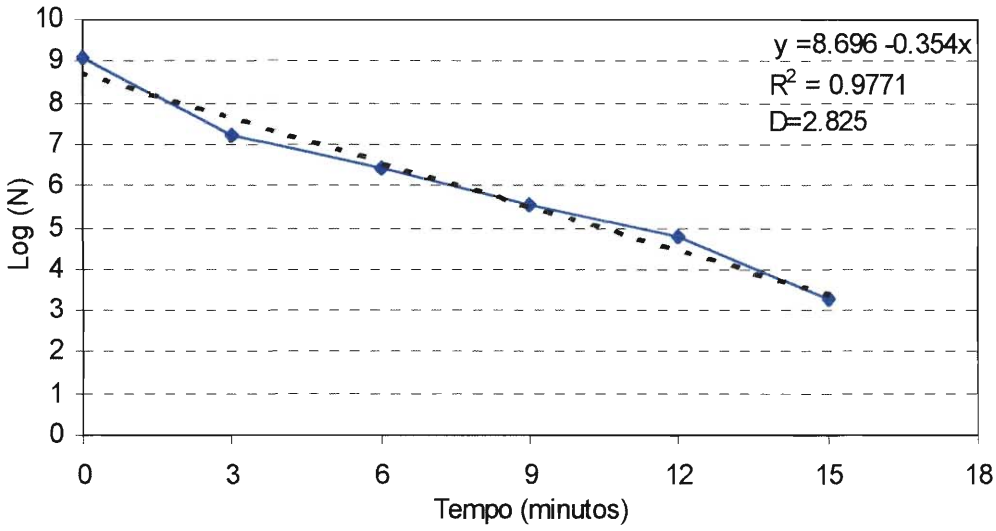

Figura 6. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^{R}, a 450mg/L, 55^{0}C.

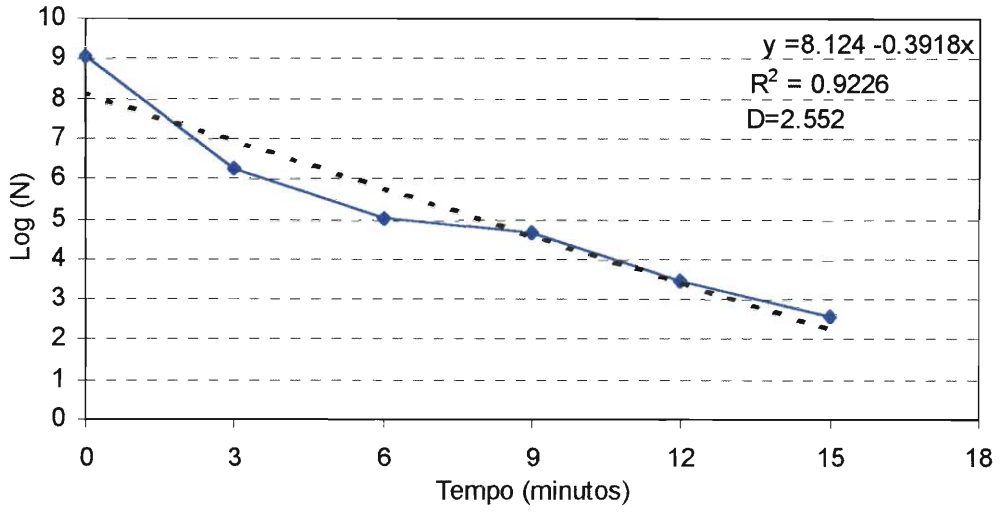

Figura 7. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposicões com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 55^{0}C.

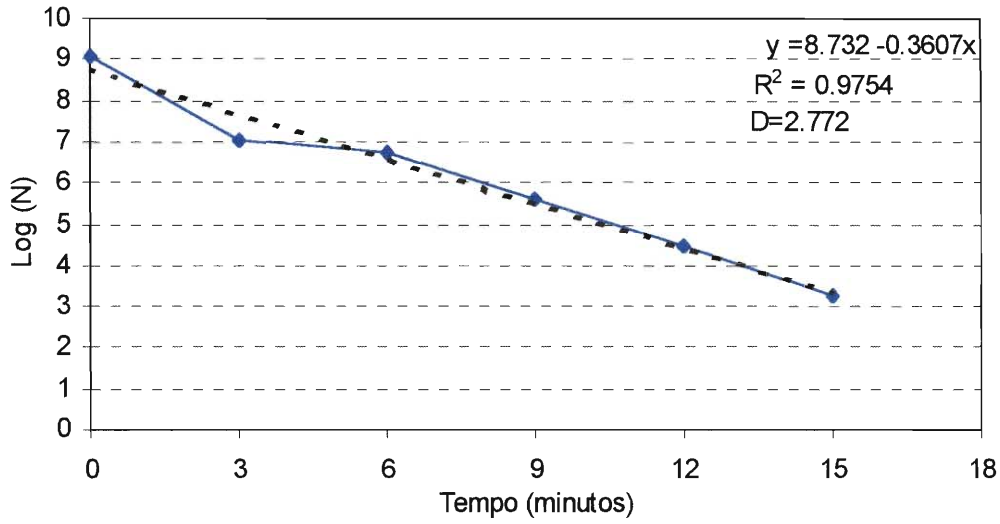

Figura 8. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 55^{0}C.

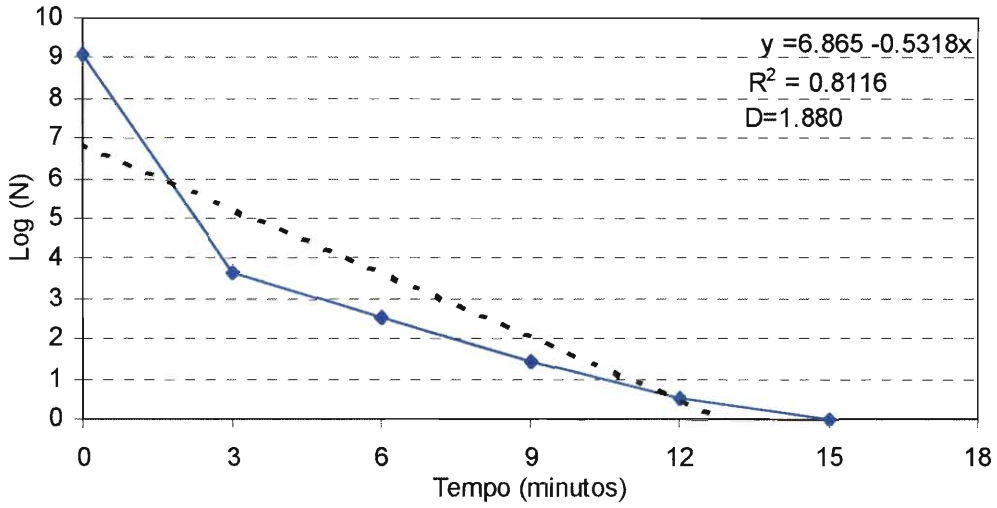

Figura 9. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^{R}, a 600mg/L, 65^{0}C.

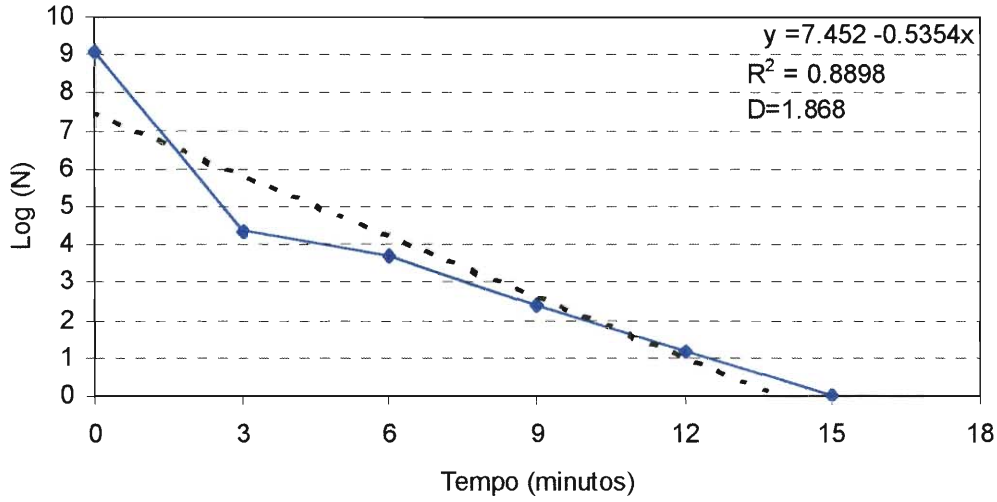

Figura 10. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 12^{R}, a 450mg/L, 65^{0}C.

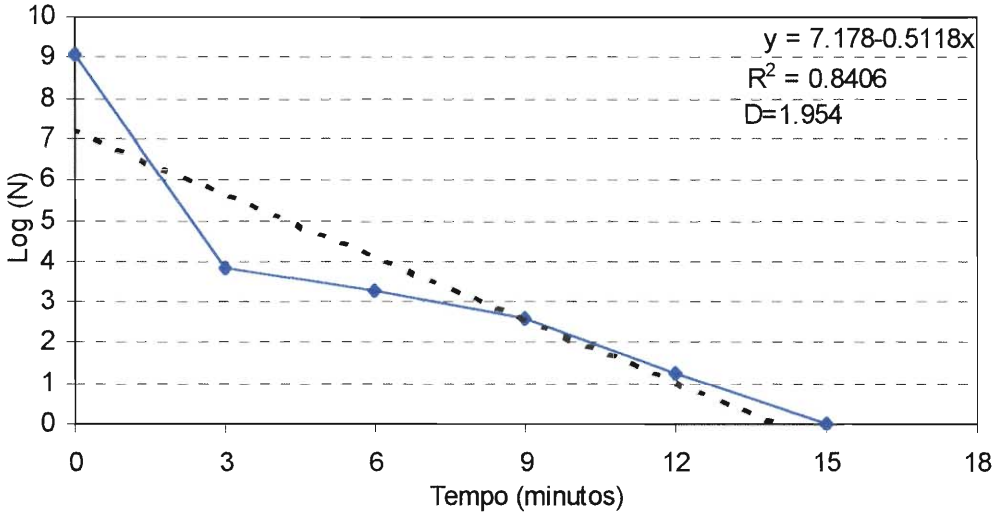

Figura 11. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposicões com Oxyfume 2002^{R}, a 600mg/L, 65^{0}C.

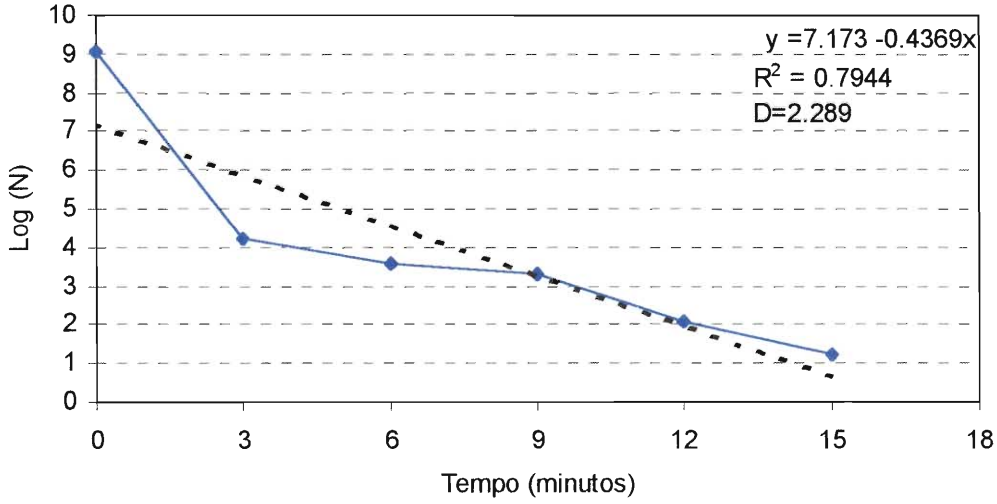

Figura 12. Curva de letalidade do monitor laboratorial, submetido a exposições com Oxyfume 2002^{R}, a 450mg/L, 65^{0}C.

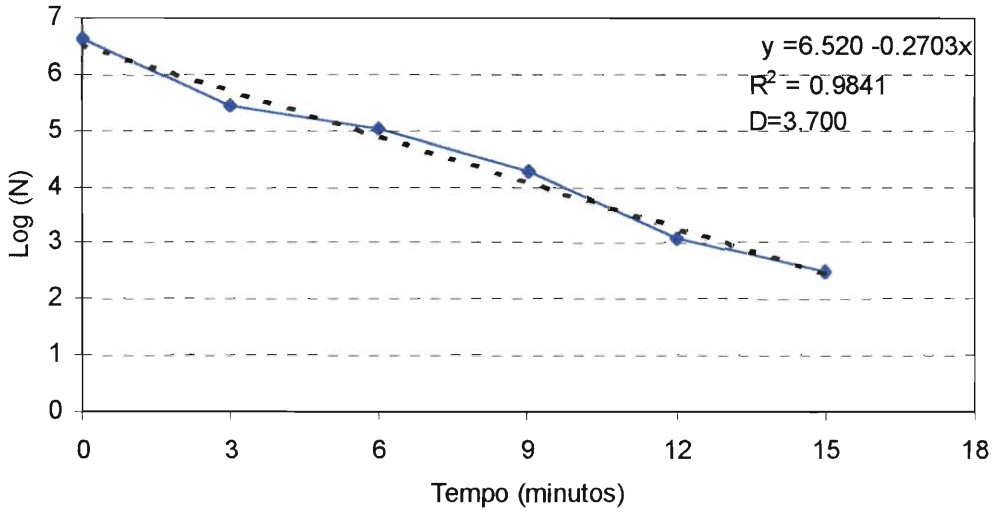

Figura 13. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 45^{0}C.

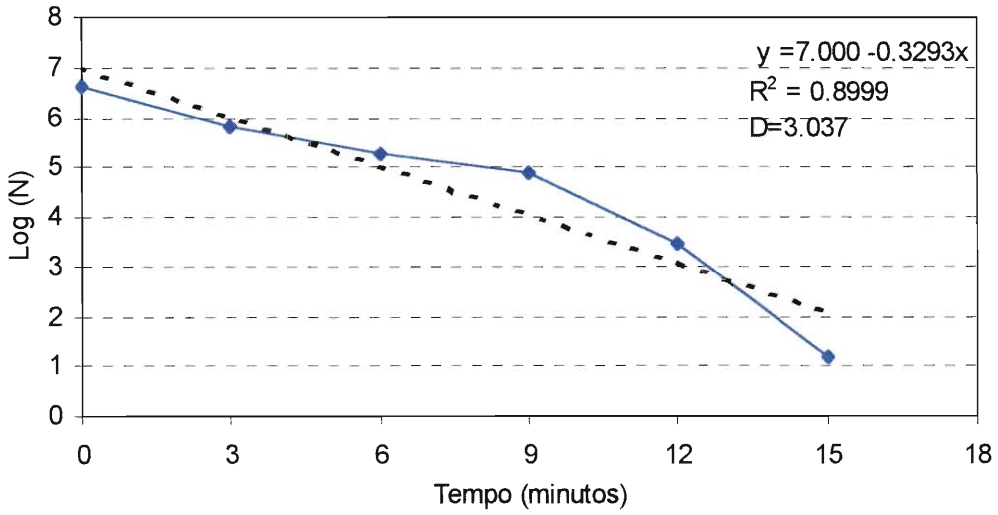

Figura 14. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 45^{0}C.

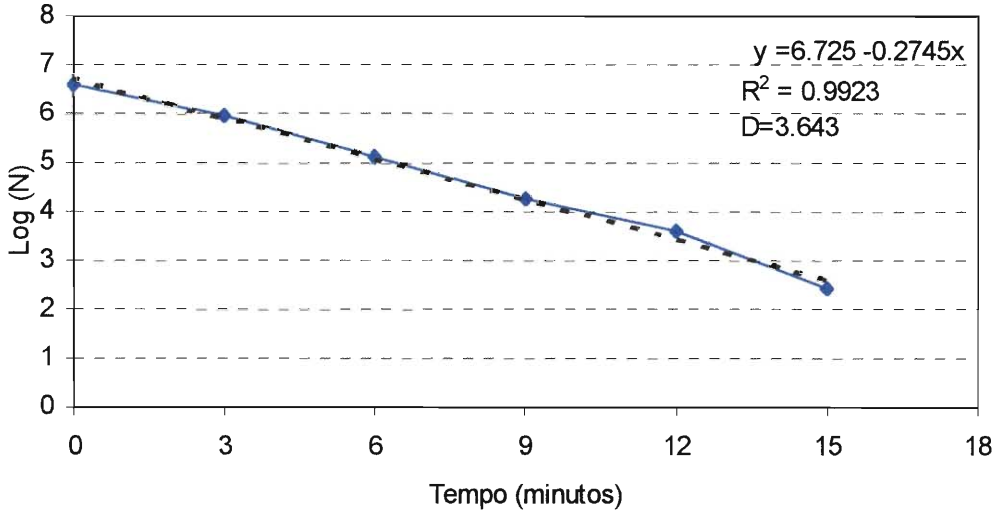

Figura 15. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 45^{0}C.

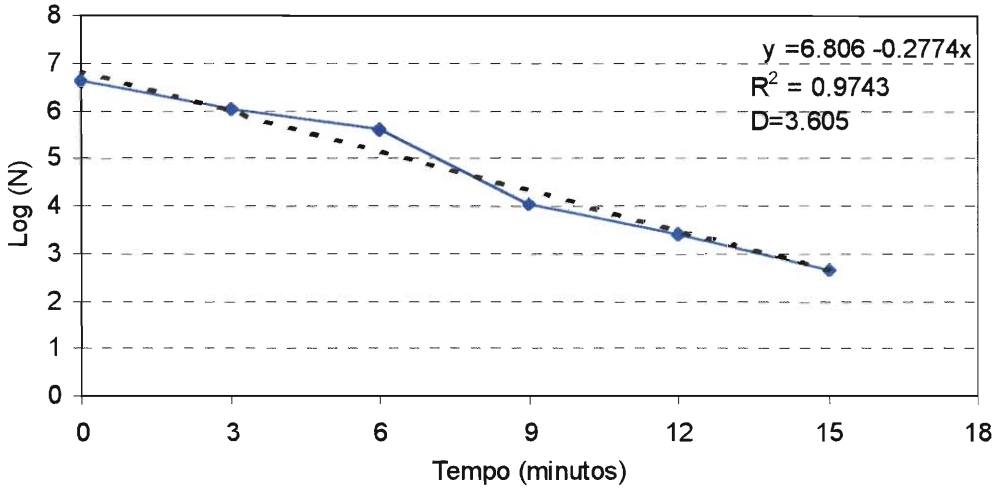

Figura 16. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 45^{0}C.

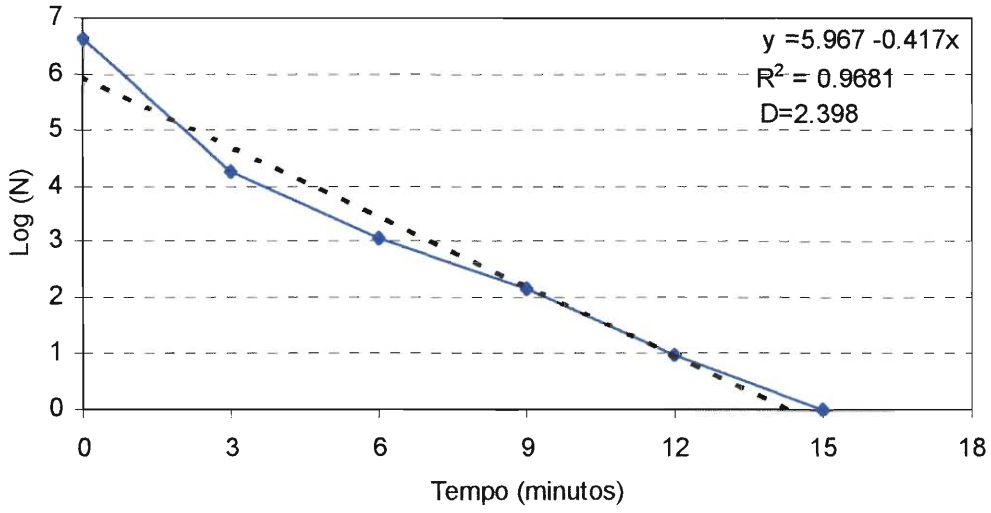

Figura 17. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 55^{0}C.

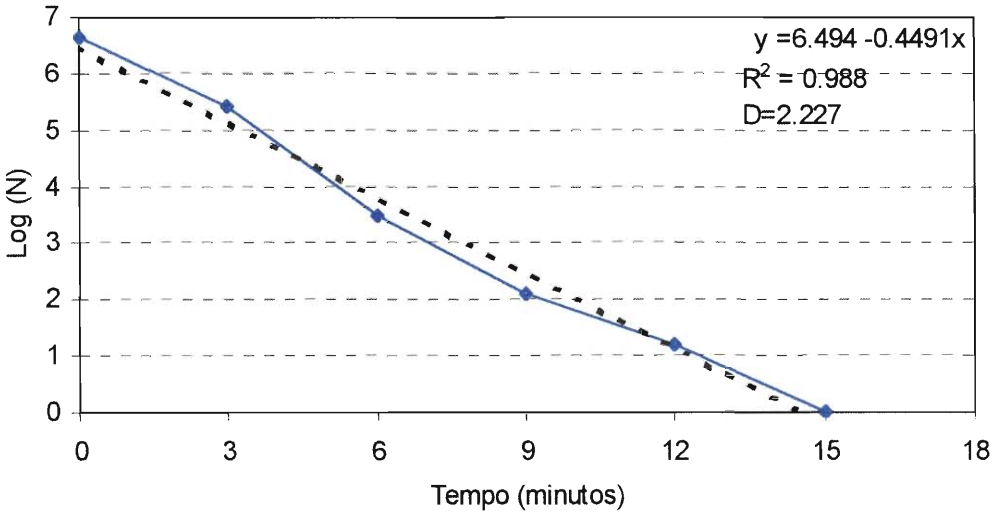

Figura 18. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 55^{0}C.

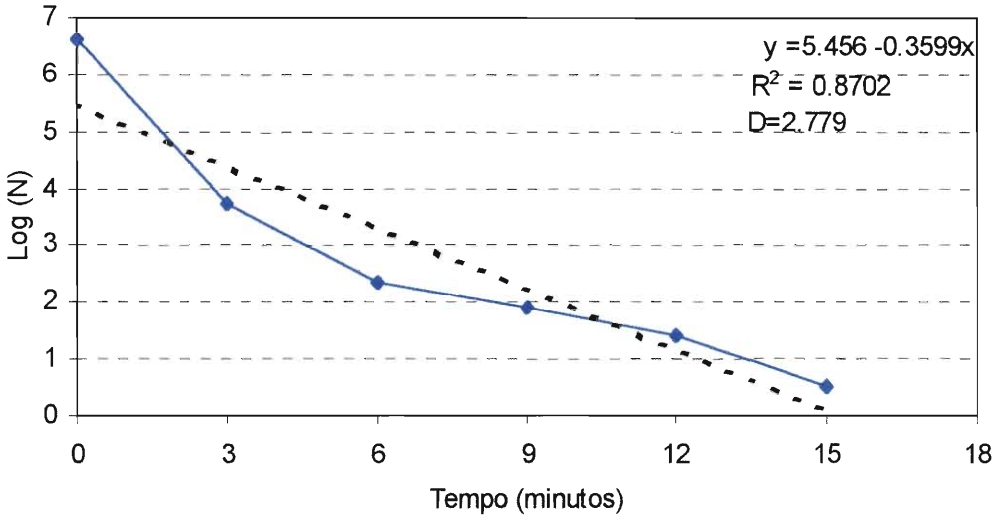

Figura 19. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 600 mg/L, 55 ^{0}C.

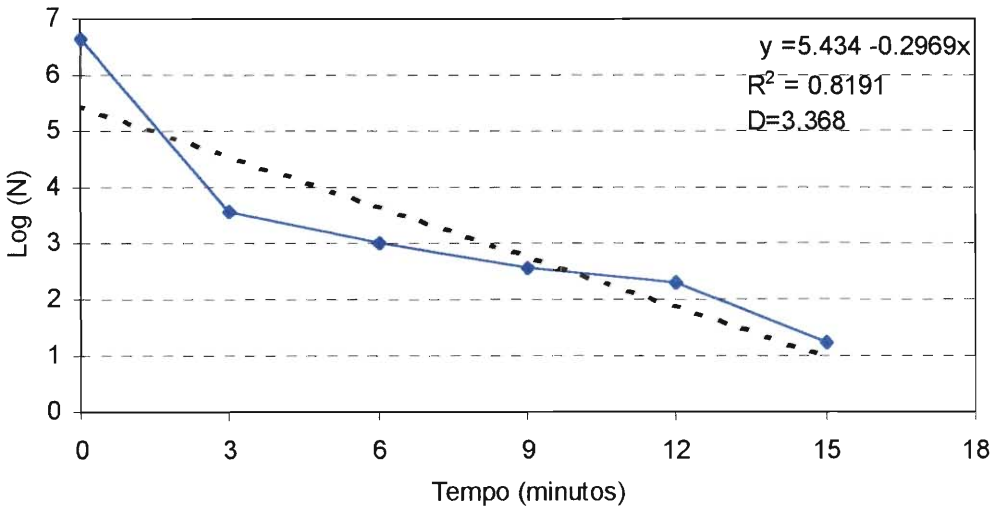

Figura 20. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450 mg/L, 55 ^{0}C.

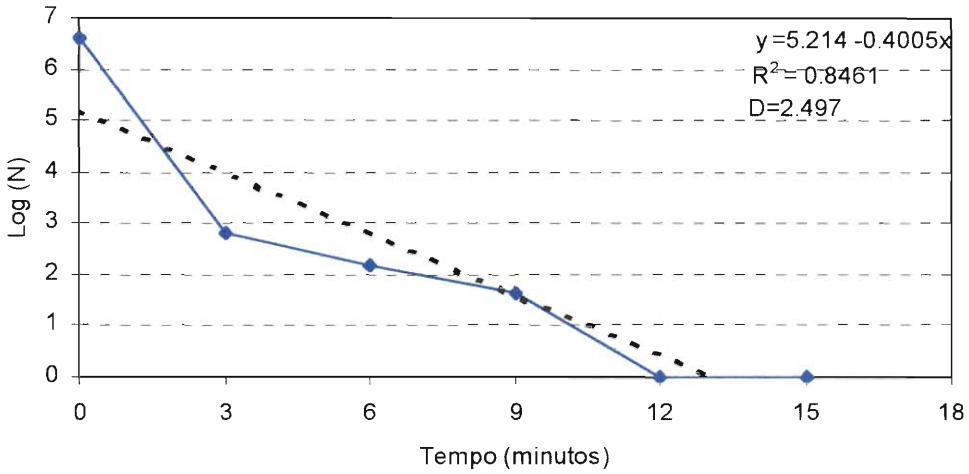

Figura 21. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 600mg/L, 65^{0}C.

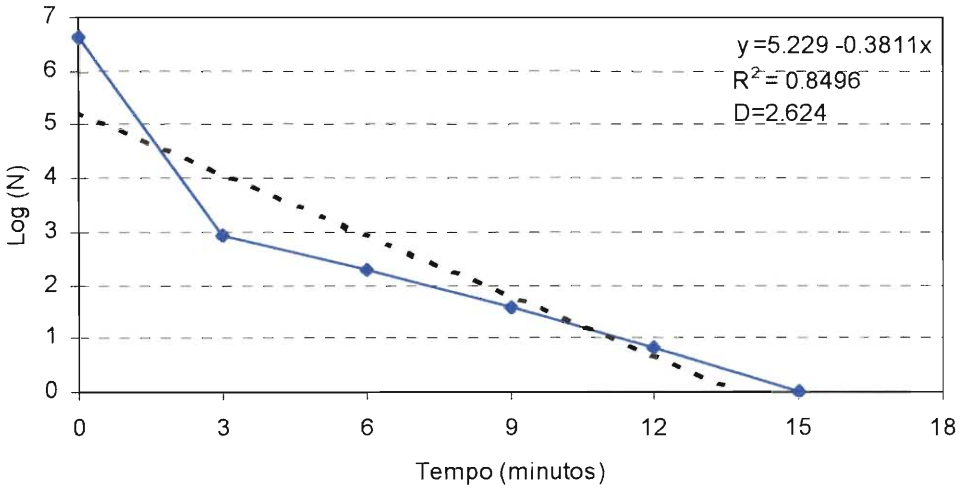

Figura 22. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 12^R, a 450mg/L, 65^{0}C.

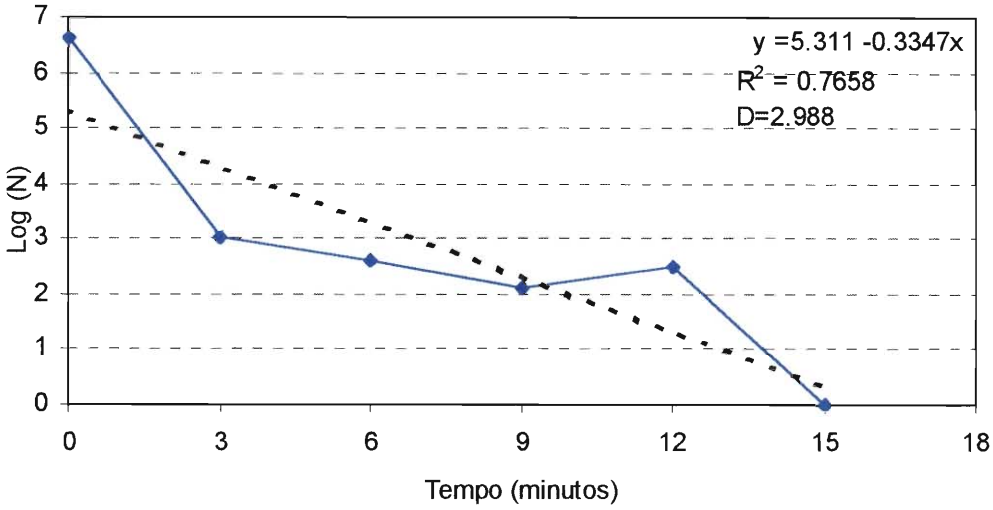

Figura 23. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 600mg/L, 65^{0}C.

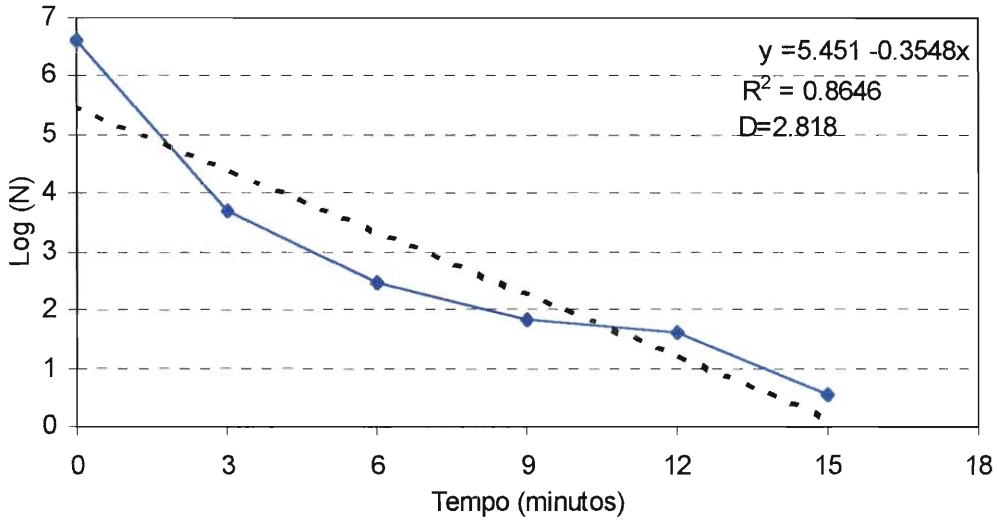

Figura 24. Curva de letalidade do monitor comercial Attest^R, submetido a exposições com Oxyfume 2002^R, a 450mg/L, 65^{0}C.

No intuito de verificar a influência da concentração gasosa (450mg/L e 600mg/L), tipo de gás (Oxyfume 12 ^{R} e Oxyfume 2002 ^{R}) e tipo de obtenção dos monitores (laboratorial e comercial Attest^{R}), nas 3 temperaturas distintas, procedeu-se a construção das figuras de 25 a 33.

As curvas visualizadas nas figuras 25, 26 e 27 mostram a influência da concentração gasosa na letalidade dos monitores a 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C. Pode-se observar que há, nas três situações, uma tendência ao paralelismo entre as curvas, evidenciando uma equivalência de letalidade para as duas concentrações distintas (450mg/L e 600mg/L), independentemente da temperatura. Apenas com o tempo de exposição de 15 minutos à temperatura de 45^{0}C observou-se maior letalidade dos monitores quando submetidos à menor concentração gasosa (450mg/L). Embora causando estranheza num primeiro momento, este comportamento é compatível com aspectos teóricos do processo. Conforme dados obtidos por FURUHASHI e MIYAMAE (48), esta tendência onde diferenciais reduzidos de concentração gasosa podem levar à equivalência de letalidade também é confirmada, sendo que para as concentrações gasosas de 400mg/L e 500mg/L, à 40^{0}C, o valor D foi igual para ambas de 7,5min.; ao mesmo tempo, para as concentrações gasosas de 500mg/L e 600mg/L, à 55^{0}C, o valor D resultou para ambas em 5,0min.

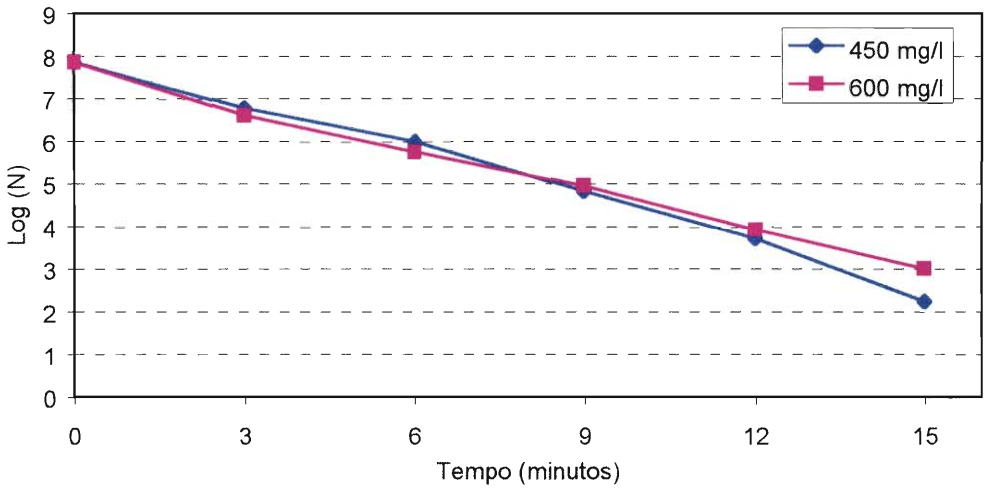

Figura 25. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e concentração de gás (600mg/L e 450mg/L), à temperatura de 45^{0}C.

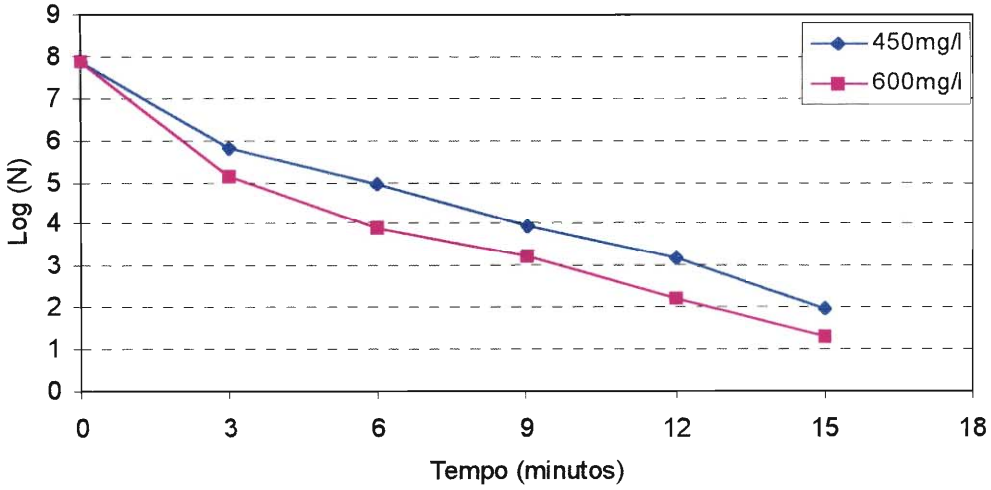

Figura 26. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e concentração de gás (600mg/L e 450mg/L), à temperatura de 55^{0}C.

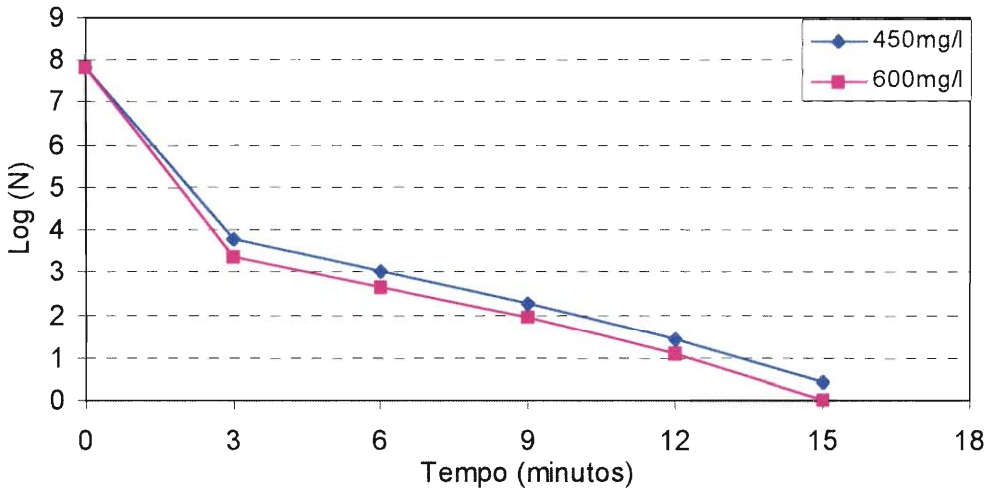

Figura 27. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e concentração de gás (600mg/L e 450mg/L), à temperatura de 65^{0}C.

Já no caso da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), para as temperaturas de 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C, conforme figuras 28, 29 e 30, respectivamente, observa-se um paralelismo muito semelhante para ambos os gases, fazendo pressupor uma condição de equivalência de letalidade para as duas misturas gasosas. Ao se atentar para a concentração do agente ativo em ambas (12% para Oxyfume 12^R e 10% para Oxyfume 2002^R), permanecem coerentes os resultados obtidos. Esta situação é reforçada observando-se dados obtidos em experimento realizado por ALFA e colaboradores (2), no qual é testada a efetividade de mistura esterilizante que agrega 90% de hidroclorofluorcarbono (HCFC, embora o mesmo não tenha sido especificado) e 10% de óxido de etileno frente ao óxido de etileno puro. Os dados obtidos demonstraram que misturas que utilizam HCFCs constituem-se em alternativas promissoras em substituição ao óxido de etileno puro, que devido à sua característica de explosividade, exige construção diferenciada de instalações. A mistura mostrou-se efetiva em 96% dos monitores biológicos desafiados contra 98% por parte do óxido de etileno puro, configurando entre ambos equivalência de letalidade.

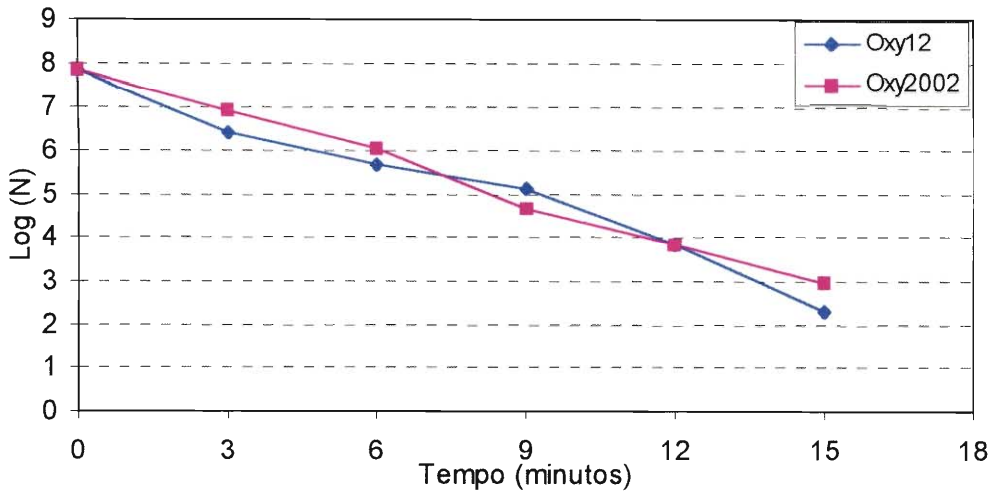

Figura 28. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), à temperatura de 45^{0}C.

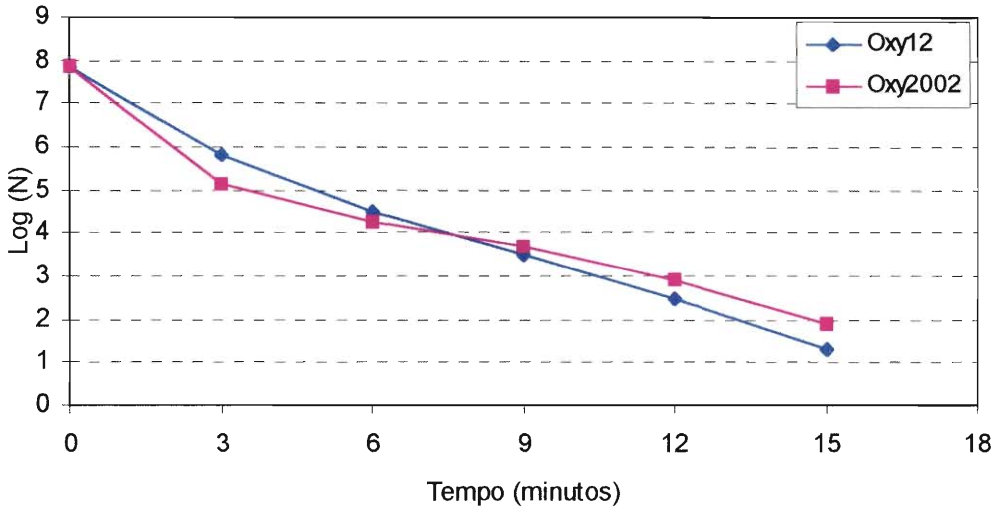

Figura 29. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), à temperatura de 55^{0}C.

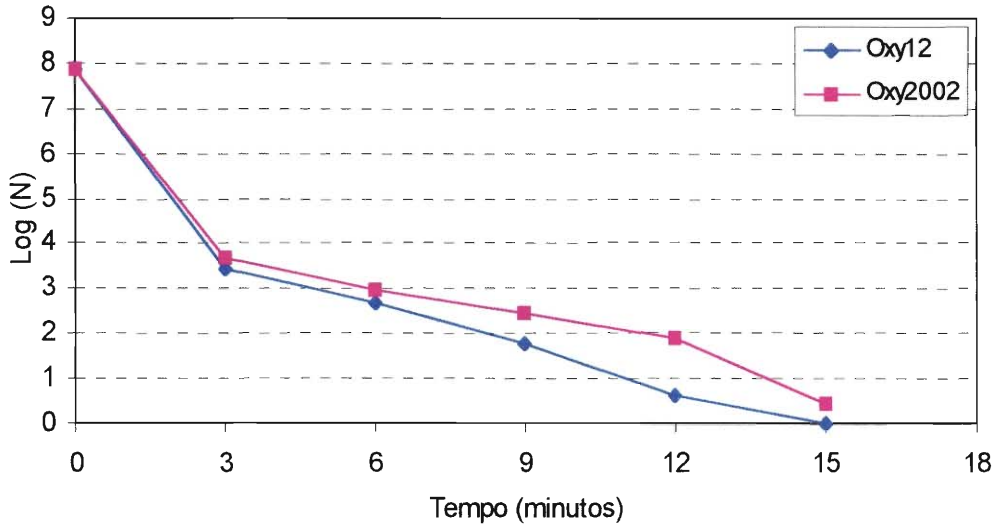

Figura 30. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e tipo de gás (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R), à temperatura de 65^{0}C.

Os resultados puderam ainda ser extrapolados para experimento anterior (2) no qual demonstrou-se ser a efetividade desta mistura (90% HCFC e 10% óxido de etileno) similar àquela proporcionada pela mistura usualmente empregada nas centrais de esterilização, mistura esta composta de 88% de clorofluorcarbono 12 (CFC 12) e 12% de óxido de etileno.

Os comportamentos semelhantes entre as misturas empregando CFCs e HCFCs tornam-se da maior importância ao se considerar aspectos de preservação da vida terrestre. Os HCFCs possuem tempo de vida na atmosfera comparativamente curto em razão de sua reatividade com radicais hidroxila (OH) na troposfera, minimizando sua chegada à estratosfera. O agente oxidante mais importante presente na troposfera é o radical OH, o qual é capaz de atacar quase todas as moléculas possuindo ligações do tipo C-H, com subsequente destruição total da molécula. Assim sendo, através de cálculos matemáticos utilizando a molécula de CH_3CCl_3, pôde-se estimar tempos de vida para alguns compostos como HCFC 22 (17 anos), HCFC 134a (11 anos) e HCFC 123 (2

anos). Cada um desses três últimos compostos têm sido considerados como substitutos aos CFCs, tanto do ponto de vista ecológico como de eficácia no uso como diluente para o gás esterilizante, frente aos mais comumente utilizados (CFC 11 e CFC 12) (106).

Mesmo ao se comparar com misturas do agente esterilizante com CO_2, emboras não contempladas no presente trabalho, permanece a vantagem do HCFC. Isto porque outra questão preocupante é a mudança na temperatura da estratosfera devido ao aumento dos " greenhouse gases", especialmente o CO_2 (105).

Com relação à influência da origem dos monitores biológicos (laboratorial e comercial Attest^R), quando estudados em desafios desenvolvidos às temperaturas de 45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C (Figuras 31, 32 e 33), observa-se inclinação levemente mais acentuada das curvas dos monitores laboratoriais (cor rosa), confirmando sua maior letalidade com relação aos monitores comerciais (cor azul), situação anteriormente mencionada. A mesma é reforçada quando se observa os valores D (Tabela 37) de ambos os monitores para todas as combinações de parâmetros.

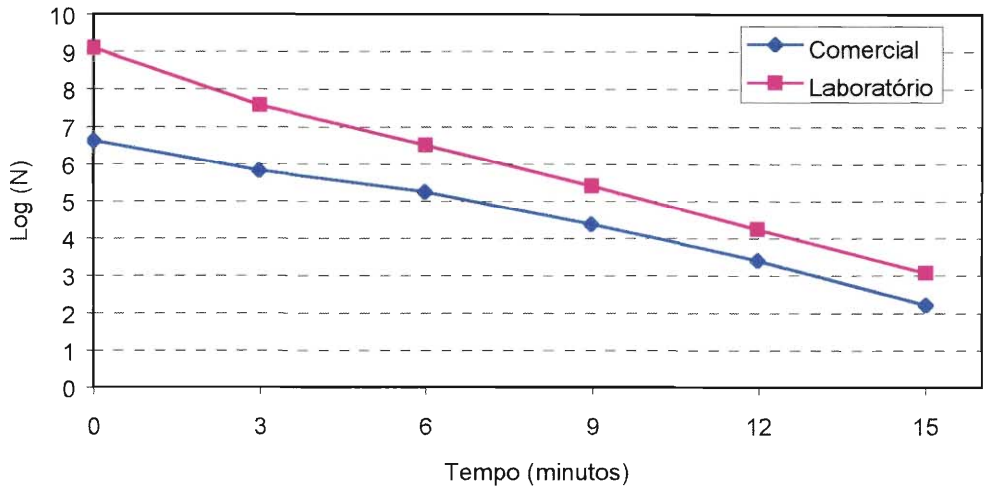

Figura 31. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e origem dos monitores (laboratorial e comercial), à temperatura de 45^{0}C.

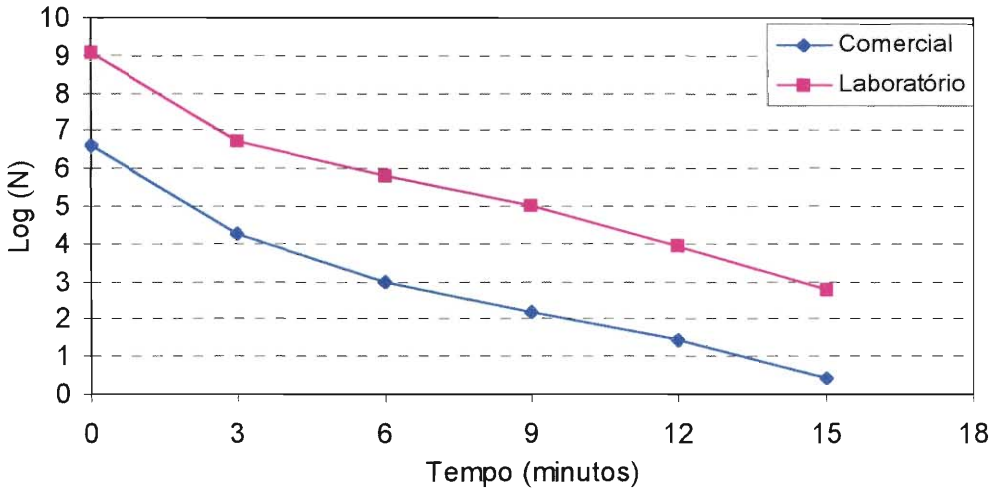

Figura 32. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e origem dos monitores (laboratorial e comercial), à temperatura de 55^{0}C.

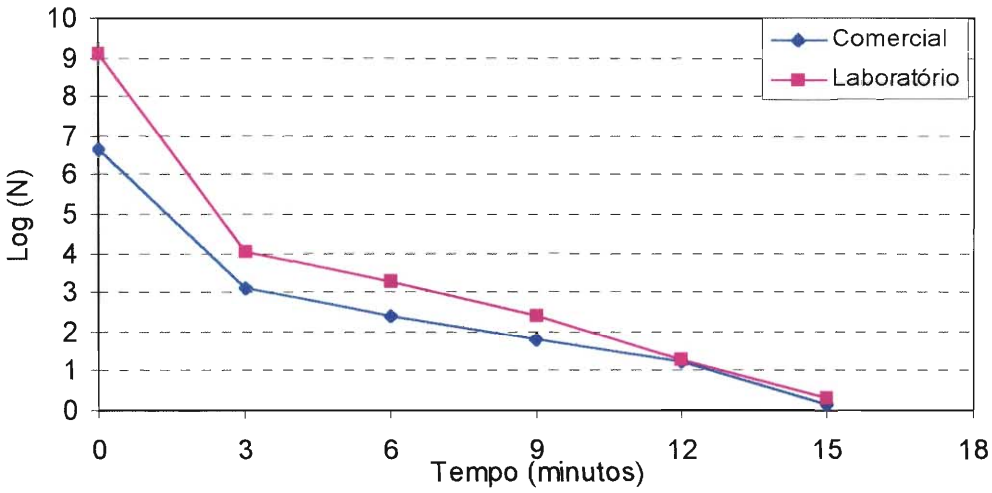

Figura 33. Curva de letalidade média representativa da interação entre tempo e origem dos monitores (laboratorial e comercial), à temperatura de 65^{0}C.

Os resultados obtidos da análise de covariância, considerando as várias fontes de variações possíveis e suas diferentes combinações estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Dados resultantes da Análise de Covariância aplicada às combinações dos efeitos da origem dos monitores biológicos, mistura esterilizante, concentração gasosa e temperatura utilizada sobre os tempos de redução decimal (D).

Fonte de Variação	GL Numerador	GL Denominador	F	p	Conclusão
Origem	1	8	11.70	0.0091	**
Gás	1	8	2.66	0.1414	?
Concentração	1	8	0.01	0.9435	NS
Temperatura	1	8	10.43	0.0121	*
Temperatura^2	1	8	0.08	0.7869	NS
Origem x Gás	1	8	0.06	0.8133	NS
Origem x Concentração	1	8	1.08	0.3294	NS
Origem x Temperatura	1	8	0.20	0.6643	NS
Gás x Concentração	1	8	0.23	0.6456	NS
Gás x Temperatura	1	8	1.30	0.2874	NS
Concentração x Temperatura	1	8	0.22	0.6519	NS
Origem x Gás x Concentração	1	8	0.35	0.5691	NS
Origem x Gás x Temperatura	1	8	0.07	0.8011	NS
Origem x Concentração x Temperatura	1	8	0.12	0.7358	NS
Gás x Concentração x Temperatura	1	8	0.07	0.7993	NS

Fonte de Variação	GL Numerador	GL Denominador	F	p	Conclusão
Origem	1	20	19.86	0.0002	**
Temperatura	1	20	17.70	0.0004	**

GL – Graus de liberdade
NS Efeito não significante
? Efeito possivelmente significante
* Efeito significante ao 5%
** Efeito significante ao 1%

A construção deste quadro, com a meta proposta, foi realizada em duas etapas. Na primeira (superior), foi ajustado um modelo com efeitos principais (linear e quadrático para temperatura) e interações (duplas e triplas); em uma segunda etapa (inferior) ajustou-se um modelo com os efeitos que se mostraram mais significativos na primeira etapa.

Além de observações que evidenciam os efeitos significantes quanto à origem dos monitores biológicos, se laboratoriais ou comerciais, fica evidente também o efeito da temperatura, promovendo maior intensidade na letalidade dos esporos.

Enquanto a diferença decorrente da preparação dos monitores deve alertar no sentido de melhorar a limpeza dos esporos, minimizando efeitos protetores de cristais ou de revestimentos (3, 96, 115), aquela atrelada à temperatura podia ser esperada tendo por base conceitos de velocidade de reação, aplicáveis a processos químicos e biológicos (40, 48, 94).

Comentário adicional pode ser feito quanto à queda mais brusca da população de esporos (log N) observada nos três primeiros minutos frente aos doze subsequentes (três a quinze), efeito acentuado nas temperaturas mais elevadas. Entretanto, os valores de r^2 obtidos para as distintas regressões (figuras 1 a 24) mostraram valores mínimo e máximo de 0,8191 e 0,9923, plenamente aceitáveis exceto em uma em que se obteve 0,7658 (Oxyfume 2002^R, 600mg/L, 65^{0}C). A única explicação que se pode encontrar para esta situação é decorrente da não homogeneidade de condições na câmara esterilizante, acentuada a temperaturas mais elevadas (65^{0}C), não usuais para este processo esterilizante, e mínima à condição frequentemente adotada (45^{0}C).

Toda a proposta de trabalho foi desenvolvida considerando como fundamental e prioritária a segurança ocupacional. Assim, procedeu-se a monitoração nas diferentes áreas ou salas, conforme orientação da Portaria Interministerial $n^0 4$ de 31 de julho de 1991 (14), a qual foi reformulada, resultando na Portaria Conjunta $n^o 1$ de 16 de dezembro de 1997 (15) republicada no Diário Oficial da União em 4 de fevereiro de 1998 para consulta pública (16). A versão definitiva, como Portaria Interministerial n° 482, de 16 de abril de 1999, foi finalmente publicada no Diário Oficial da União de 19 de abril de 1999 (17). Em conformidade a esta portaria, as áreas monitoradas foram: área de depósito de cilindros, sala de preparação de materiais, sala de comando, sala de aeração/armazenagem de materiais esterilizados, sala de esterilização e internamente à câmara esterilizante. Observa-se na Tabela 38 que, a partir de novembro, todos os resultados de leitura contemplaram a exigência legal de < 1ppm de resíduo de óxido de etileno (1,8mg/m^3). Acima de tudo, permite que se prossiga com novos projetos a serem desenvolvidos, sem colocar em risco a saúde dos pesquisadores envolvidos.

Tabela 38. Controle de resíduos ambientais de óxido de etileno nas dependências da Central de Esterilização.

Data	T (°C)	Umidade relativa (%)	RESÍDUO DE ÓXIDO DE ETILENO (ppm)					
			Sala de preparo de materiais	Sala de comando	Sala de aeração/ armazena-mento	Sala de esterilização	Interior da câmara esterilizan-te	Área de depósito de cilindros
19/10/98	26	72	< 1	< 1	< 1	2	15	< 1
10/11/98	26	80	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
15/12/98	27	75	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
13/01/99	27	72	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
08/02/99	26	72	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
17/03/99	25	72	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
09/04/99	23	70	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
12/05/99	21	70	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
10/06/99	19	68	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
14/07/99	18	68	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
06/08/99	18	68	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

ppm = partícula por milhão

A reduzida periculosidade dos CFCs e HCFCs empregados como diluentes das misturas gasosas esterilizantes utilizadas, tendo em vista também os eficazes sistemas de ventilação e exaustão empregados, dispensaram monitoração específica para estes agentes.

Segundo SIDEBOTTOM e colaboradores (117), considerável conjunto de dados disponíveis atualmente sobre os HCFCs levam a concluir que são alternativas realmente muito promissoras, uma vez que estes compostos apresentam insignificante contribuição na depleção da camada de ozônio, aquecimento global e níveis de cloro ou bromo em precipitação. Os autores referem-se aos HCFCs 22, 124, 123, 141b e 142b, os quais possuem tempos de vida na atmosfera de, respectivamente, 13,3; 5,9; 1,4; 9,4 e 19,5 anos, bem como potenciais de depleção do ozônio de, respectivamente, 0,05; 0,03; 0,02; 0,10 e 0,066. Esses compostos foram escolhidos como substitutos por apresentarem as mesmas propriedades desejáveis dos CFCs (baixa toxicidade, baixa ou zero flamabilidade, baixa condutividade térmica da fase gasosa, baixa corrosibilidade durante uso e custo razoável), bem como por possuírem pelo menos uma ligação C-H, sendo degradados a nível de troposfera através da reação com radicais OH, restando somente pequena fração não degradada que pode vir a atingir a estratosfera. Portanto, em razão da sua superior aceitabilidade ambiental, os HCFCs desempenharam função essencial na substituição aos CFCs, assegurando a rápida eliminação dos mesmos.

Assim, ao pensarmos que nas próximas décadas, corre-se o risco de estar a atmosfera saturada de compostos halogenados, situação que apenas uma explosão vulcânica estaria revertendo (105), urgem atitudes corretivas e preventivas a respeito. Desse modo, espera-se que o presente trabalho possa se constituir em colaboração efetiva no sentido de preservação da terra e da espécie humana.

6. CONCLUSÃO

1. Para efeitos práticos esterilizantes, as misturas de óxido de etileno em CFC 12 (Oxyfume 12^R) e em HCFCs 22 e 124 (Oxyfume 2002^R) mostraram-se equivalentes.

2. As diferentes concentrações, de 450mg/L e 600mg/L, não promoveram alterações significantes na letalidade a qualquer das duas misturas esterilizantes estudadas (Oxyfume 12^R e Oxyfume 2002^R).

3. O valor de redução decimal (D), característica de resistência do *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 sob condições definidas, mostrou-se significantemente (p=1%) influenciado pelas temperaturas de trabalho (45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C).

4. Houve diferença estatisticamente significante (p=1%) entre os indicadores biológicos comercialmente adquiridos (Attest^R 1264, 3M) e os de obtenção laboratorial, que se mostraram menos resistentes.

5. O atendimento às condições de engenharia obedecendo a exigências da Portaria Interministerial n^0 482, publicada em sua versão final em 19 de abril de 1999 permite que se obtenham níveis de resíduos ambientais compatíveis com a presença humana, minimizando riscos ocupacionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMDUR, M.O., MEAD, J. The respiratory response of guinea pigs to inhalation of ethylene oxide. *AMA Arch. Ind. Health*, Chicago, v.14, p.553-559, 1957.

2. ALFA, M.J., DE GAGNE, P., OLSON,N. Bacterial ability of ethylene oxide plus 90% hydrochlorofluorocarbon sterilizing gas. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Thorofare, v.18, n.9, p.641-645, 1997.

3. ALFA, M.J., DE GAGNE, P., OLSON, P., PUCHALSKI, T. Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Thorofare, v.17, n.2, p.92-100, 1996.

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

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

De acordo com a norma NBR 6023/90 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1997. [cd-rom}

6. ANDERSON, P.O. Chlorofluorocarbons in medicinals. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.47, n.6, p.1382-1385, 1990.

7. AUSTIN, S.G., SIELKEN, R.L. Issues in assessing the carcinogenic hazards of ethylene oxide. *J. Occup. Med.*, Chicago, v.30, n.3, p.236-245, 1988.

8. BARD INTERNATIONAL. 100% Ethylene oxide information. CFC Reduction. Options to CFC. Economic comparison. Murray Hill, 1990. 32 p [Information Bulleti].

9. BARGIGIA, G. Controllo delle emissioni di sostanze che interferiscono com lo strato di ozono. *Chim. Ind.*, Milan,v.70, n.5, p.10-16, 1988.

10. BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 18ed. São Paulo: Melhoramentos. 1977. p.843.

11. BLOOMFIELD, S.F., MEGID, R. Interaction of iodine with Bacillus subtilis spores and spore forms. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.76, n.5, p.492-499, 1994.

12. BOLT, H.M., LEUTBECHER, M., GOLKA, K. A note on the physiological background of the ethylene oxide adduct 7-(2-hydroxyethyl) guanine in DNA from human blood. *Arch. Toxicol.*, Berlin, v.71, n.11, p.719-721, 1997.

13. BOLT, H.M. Quantification of endogenous carcinogens. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.52, p.1-5, 1996.

14. Brasil.Leis, decretos, etc. Portaria n°4 de 31 de julho de 1991. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 jul. 1991. Seção 1.

15. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria n°1 de 16 de dezembro de 1997. *Diário Oficial da União* ,Brasília, 17 dez. 1997. Seção 1.

16. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria n°1 de 4 de fevereiro de 1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, 4 fev. 1998. Seção 1.

17. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria Interministerial n^0 482 de 16 de abril de 1999. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 abr 1999. Seção 1.

18. BRITTON, L.G. Thermal stability and deflagration of ethylene oxide. *Plant Oper. Prog.*, New York, V.9, p.75-86, 1990.

19. BRYANT, H.E., VISSER, N.D., YOSHIDA, K. Ethylene oxide sterilizer use and short-term symptoms amongst workers. *J. Soc. Occup. Med.*, Bristol, v.39, n.3, p.101-106, 1989.

20. BURGESS, D.J., REICH, R.R. Industrial ethylene oxide sterilization. In: **Sterilization technology: a practical guide for manufactures and users of health care products**. New York: Morrisey, 1993. cap.7, p.152-195.

21. CAWSE, J.N., HENRY, J.P., SWARTZLANDER, M.W., WADIA, P.H. Ethylene oxide. In: KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of chemical technology.** 3° ed., New York: Wiley-Intersciense, 1980. v.9, p.432-71.

22. CHAIGNEAU, M. Action de l'oxyde d'éthylène sur des plantes médicinales et des épices: absorption et combinaison. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.41, n.4, p.385-390, 1983.

23. CHAIGNEAU, M. Avantages et inconvénients de la stérilisation par l'oxyde d'éthylène du matériel médico-chirurgical et des produits pharmaceutiques. *Bull. Ac. Nat. Med.*, Paris, v.167, n.6, p.627-631, 1983.

24. CHIOUA, C., CALOP, J., LEGLISE, P., LUU DUC, C. Dosage de l'oxyde d'éthyléne résiduel dans les seringues non réutilisables. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.46, n.3, p.185-195, 1988.

25. COGSWELL, P.F. Determination of ethylene oxide in "12/88" sterilizing gas mixture by infrared spectroscopy. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.37, n.1, p.6-9, 1983.

26. CUMMINS, K.J., SCHULTZ, G.R., LEE, J.S., NELSON, J.H., READING, J.C. The development and evaluation of a hydrobromic acid-coated sampling tube for measuring occupational exposures to ethylene oxide. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Arkron, v.48, n.6, p.563-573, 1987.

27. DADD, A.H., DALEY, G.M. Role of the coat in resistance of bacterial spores to inactivation by ethylene oxide. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.53, n.1, p.109-116, 1982.

28. DADD, A.H., MC CORMICK, K.E., DALEY, G.M. Factors influencing the resistance of biological monitors to ethylene oxide. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.55, n.1, p.39-48, 1983.

29. DADD, A.H., STEWART, C.M., TOWN, M.M. A standardized monitor for the control of ethylene oxide sterilization cycles. *J. Hyg.*, Cambridge, v.91, n.1, p.93-100, 1983.

30. DADD, A.H., TOWN, M.M., MC CORMICK, K.E. The influence of water on the resistance of spores to inactivation by gaseous ethylene oxide. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.58, p.613-621, 1985.

31. DAVOIS, C.L., CHAIGNEAU, M., LE MOAN, G. Stérilisation de pansements par l'oxyde d'éthylène. I. Physisorption. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.40, n.2, p.125-132, 1982.

32. DELATTRE, L., DE SEILLE, J.M., JAMINET, F., MEURICE, L. Etude de la desorption de l'oxyde d'ethylene a partir de differentes matieres plastiques sterilisees par ce gaz. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v.40, n.3, p.163-167, 1985.

33. DEN ELZEN, M.G.J., SWART, R.J., ROTMANS, J. Strengthening the Montreal Protocol? Does it cool down the greenhouse? *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.113, n.3, p.229-250, 1992.

34. DENYER, S.P., BAIRD, R.M. **Guide to microbiological control in pharmaceuticals**. 1°ed., Chinchester: Ellis Horwood, 1990. 389p.

35. DODD, D.E., BRASHEAR, W.T., VINEGAR, A. Metabolism and pharmacokineticas of selected halon replacement candidates. *Toxicol. Letters*, Amsterdan, v.68, p.37-47, 1993.

36. ELLIOT, L., MORTIMER, V., RINGENBURG, V., KERCHER, S., O'BRIEN, D. Effect of engineering controls and work practices in reducing ethylene oxide exposure during the sterilization of hospital supplies. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v.14, n.1, p.40-42, 1988.

37. ELLIOTT, S., ROWLAND, F.S. Chlorofluorocarbons and stratospheric ozone. *J. Chem. Educ.*, Washington, v.64, n.5, p.387-391, 1987.

38. ERNST, R.R., DOYLE, J.E. Sterilization with gaseuos ethylene oxide: a review of chemical and physical factors. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v.10, p.1-31, 1968.

39. ERNST, R.R. Ethylene oxide gaseous sterilization for industrial applications. In: PHILLIPS, G.B. & MILLER, W.S., **Industrial sterilization.** Durham: Duke University Press, 1972. p. 181-208.

40. ERNST, R.R., SHULL, J.J. Ethylene oxide gaseous sterilization. I. Concentration and temperature effects. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.10, p.337-41, 1962.

41. ESTRIN, W.J., BOWLER, R.M., LASH, A., BECKER, C.E. Neurotoxicological evaluation of hospital sterilizer workers exposed to ethylene oxide. *J. Toxicol.*, New York, v.28, n.1, p.1-20, 1990.

42. EUROPEAN STANDARD. **Sterilization of medical devices – validation and routine, control of ethylene oxide sterilization**. Brussels: European Committee for Standardization (CEN), 1994. p.1-23.

43. FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1, cap.X.1 e X.2.

44. FEDOROFF, B.T., SHEFFIELD, O.E. **Encyclopedia of explosives and related items**. New Jersey: Picatinny Arsenal, 1974. v.6, p.282-8.

45. FONSECA, A.A., CAMPINHO, M. A., ARBILLA, G. Modelo numérico para as reações químicas do ozônio na estratosfera. *Química Nova*, São Paulo, v.19, n.4, p.361-371, 1996.

46. FRIEBEN, W.R., ROBERTSON, J.H., GOETZ, J.F., ENZINGER, R.M. Measurement of ethylene oxide and water vapor in powders during sterilization. *J. Parent. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.37, n.1, p.4-6, 1983.

47. FUCHS, J., WULLENWEBER, U., HENGSTLER, J.G., BIENFAIT, H.G., HILTL, G., OESCH, F. Genototoxic risk for humans due to work place exposure to ethylene oxide: remarkable individual differences in susceptibility. *Arch. Toxicol.*, Berlin, v.68, p.343-348, 1994.

48. FURUHASHI, M., MIYAMAE, T. Ethylene Oxide Sterilization of Medical Devices – With Special Reference to the Sporicidal Activity and Residual Concentration of Ethylene Oxide and its Secondary Products. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, Tokyo, v.29, p.23-35, 1982.

49. GRANATH, F., ROHLÉN, O., GÖRANSSON, C., HANSSON, L., MAGNUSSON, A-L., TÖRNQVIST, M. Relationship between dose in vivo of ethylene oxide and exposure to ethene studied in exposed workers. *Hum. Experiment. Toxicol.*, Basingstoke, v.15, n.10, p.826-833, 1996.

50. GRIFFITH, C.L., HALL, L.A. Sterilization process. U.S. Pat. 2.189.947, 1940. Apud: PHILLIPS, C.R., KAYE, S. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. I. Review. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, v.50, p.270-279, 1949.

51. GROSS, P.M., DIXON, L.F. Method of sterilizing. U.S. Pat. 2.075.845, 1937. Apud: PHILLIPS, C.R., KAYE, S. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. I. Review. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, v.50, p.270-279, 1949.

52. HALLECK, F.E. Principles for the validation of EtO sterilization cycles. *Med. Device Diagn. Ind.*, Santa Monica, v.2, p.27-30, 1980.

53. HANSEN, J.P., ALLEN, J., BROCK, K., FALCONER, J., HELMS, M.J., SHAVER, G.C., STROHM, B. Normal sister chromatid exchange levels in hospital sterilization employees exposed to ethylene oxide. *J. Occup. Med.*, Chicago, v.26, n.1, p.29-32, 1984.

54. HASTRUP, B. Use of biological monitors for validation and cycle control in ethylene oxide sterilization. In: **Workshop on biological monitoring of sterilization**. London: Eucomed, 1986. p.57-71.

55. HEALY, J., LEE, R.T.S., PERROTA, D., VAN AUKEN, O.W. Effects of fluorocarbons on biological systems. *Texas J. Sci.*, Austin, v.25, p.145, 1974.

56. HODGES, N.A.,MELLING, J., PARKER, S.J. A comparison of chemically defined and complex media for the production of *Bacillus subtilis* spores having reproducible resistance and germination characteristics. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.32, p.126-30, 1980.

57. HOET, P., GRAF, M.L.M., BOURDI, M., POHL, L.R., DURAY, P.H., CHEN, W., PETER, R.M., NELSON, S.D., VERLINDEN, N., LISON, D. Epidemic of liver disease caused by hydrochlorofluorocarbons used as ozone-sparing substitutes of chlorofluorocarbons. *Lancet*, London, v.350, n.9077, p.556-559, 1997.

58. HOGSTEDT, C., MALMQVIST, N., WADMAN, B. Leukemia in workers exposed to ethylene oxide. *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.241, n.11, p.1132-1133, 1979.

59. HOWARD, P.H., HANCHETT, A. Chlorofluorocarbon sources of environmental contamination. *Science*, Washington, v.189, n.4198, p.217-219, 1975.

60. HUGO, W.B., RUSSEL, A.D. **Pharmaceutical microbiology**. 3°ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983. 470p.

61. JONES, R. R. Ozone depletion and its effects on human populations. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 127, n° 41, p. 2-6, 1992.

62. JUHLIN, I., LINDQVIST, S.B., NYSTRAND, R. Post-cycle sporicidal effect of ethylene oxide – a new concept. *J. Parent. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.39, n,6, p.223-230, 1985.

63. JUNE, R.K., DYE, R.F. Explosive decomposition of ethylene oxide. *Plant Oper. Prog.*, New York, v.9, p.67-74, 1990.

64. KARELOVÁ, J., JABLONICKÁ, A., VARGOVÁ, M. Results of cytogenetic testing of workers exposed to ethylene oxide. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol.*, Prague, v.31, n.2, p.119-126, 1987.

65. KEYNAN, A., BERNS, A.A., DUNN, G.,YOUNG, M., MANDELSTAM, J. Resporulation of Outgrowing *Bacillus subtilis* Spores. *J. Bact.*, Baltimore, v.128, n.1, p.8-14, 1976.

66. KLEES, J.E., LASH, A., BOWLER, R.M., SHORE, M., BECKER, C.E. Neuropsychologic "impairment" in a cohort of hospital workers chronically exposed to ethylene oxide. *Clin. Toxicol.*, New York, v.28, n.1, p.21-28, 1990.

67. KORPELA, D.B., McJILTON, C.E., HAWKINSON, T.E. Ethylene oxide dispersion from gas sterilizers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.44, n.8, p.589-591, 1983.

68. KRISTENSEN, H. Ethylene oxide resistance of micro-organisms in dust compared with the resistance of *Bacillus subtilis* spores. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol.*, Copenhagen, v.*78*, p.298-304, 1970.

69. LAO, N.T., LU, H.T.C., REGO, A., KOSAKOWSKI, R.H., BURGESS, D.J., HUME, R.D. Interlaboratory comparison of analytical methods for residual ethylene oxide at low concentration levels in medical device materials. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.84, n.5, p.647-655, 1995.

70. LAURENT, C., FREDERIC, J., LÉONARD, A.Y. Sister chromatid exchange frequency in workers exposed to high levels of ethylene oxide, in a hospital sterilization service. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.54, n.1, p.33-43, 1984.

71. LEE, W.H., ORDAL, Z.J. Reversible activation for germination and subsequent changes in bacterial spores. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.85, p.207-17, 1963.

72. LEHMANN, P. The ozone hole. *Med. J. Aust.*, Glebe, v.163, n.4, p.576-578, 1995.

73. LEMKE, H.D., HEIDLAND, A., SCHAEFER, R.M. Hypersensitivity reactions during haemodialysis: role of complement fragments and ethylene oxide antibodies. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, Berlim, v.5, n.4, p.264-269, 1990.

74. LYARSKII, P.P., LIKHTMAN, T.V., KAREYEV, N.V., KOMARKOVA, N.I., GLEIBERMAN, S.E. Physico-chemical and toxico-hygienic aspects of using ethylene oxide for the sterilization of medical appliances. *J. Hyg. Epidemiol., Microbiol. Immunol.*, Prague, v.28, n.2, p.119-128, 1984.

75. LYARSKII, P.P., KOPYLOVA, L.S., GLEIBERMAN, S.E., ZAYEVA, G.N., KOLESNIKOVA, N.I. Physico-chemical and toxico-hygienic aspects of using ethylene oxide for the sterilization of articles for medical use. *J. Hyg. Epidemiol., Microbiol. Immunol.*, Prague, v.30, n.1, p.33-41, 1986.

76. MAJOR, J., JAKOB, M.G., TOMPA, A. Genotoxicological investigation of hospital nurses occupationally exposed to ethylene oxide: I. chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges, cell cycle kinetics, and UV-induced DNA syntesis in peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutag.*, New York, v.27, n.2, p.84-92, 1996.

77. MANZER, L.E. The CFC-ozone issue: progress on the development of alternatives to CFCs. *Science*, Washington, v.249, n.4964, p.31-35, 1990.

78. MASON, N.J., PATHAK, S.K. Spectroscopic studies of ozone – the earth's UV filter. *Contemporary Physics*, London, v.38, n.4, p.289-299, 1997.

79. MASIN, G., POLENAKOVIC, M., IVANOVSKI, N., ATANASOV, N., OLIVERA, S., CAKALAROSKI, K. Hypersensitivity reactions to ethylene oxide: clinical experience. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, Berlim, v.6, p.50-52, 1991.

80. MAUGH, T.H. What the risk from chlorofluorcarbons? *Science*, Washington, v.223, n.4640, p.1051-1052, 1984.

81. MA WU, N., MALININ, I.T. High performance liquid chromatography determination of ethylene glycol and ethylene chlorohydrin in tissues. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.11, n.2, p.63-66, 1987.

82. MATTHEWS, I.P., GIBSON, C., SAMUEL, A.H. Enhancement of the kinetics of the aeration of ethylene oxide sterilized polymers using microwave radiation. *J. Biom. Mat. Res.*, New York, v.23, n.2, p.143-156, 1989.

83. MC DONALD, R.L. Method of sterilizing. U.S. Pat. 3.068.064, 1962. Apud: ERNST, R.R. Ethylene oxide gaseous sterilization for industrial application. PHILLIPS, G.B. & MILLER, W.S., eds. **Industrial sterilization**. Durham: Duke University Press, 1972. p. 181-208.

84. MCFARLAND, M. Chlorofluorocarbons and ozone. *Environ. Sci. Technol.*, Washington, v.23, n.10, p.1203-1207, 1989.

85. MCFARLAND, M., KAYE, J. Chlorofluorocarbons and ozone. *Photochem. Photobiol.*, Oxford, v.55, n.6, p.911-929, 1992.

86. MURAZ, B., CHAIGNEAU, M., LE MOAN, G. Stérilisation de pansements par l'oxyde d'éthylène. II. Chimisorption. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.40, n.3, p.207-212, 1982.

87. MURAZ, B., CHAIGNEAU, M. Sur la décontamination des épices par l'oxyde d'éthylene.Cas du girofle (*Eugenia caryophyllus* Spreng.) et du poivre blanc (*Piper nigrum* L.). *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.43, n.1, p.15-21, 1985.

88. MURREL, W.G. **The bacterial spore**. London: Academic Press, 1969. p. 215-73; 611-70. Apud: KUJALA, T., KAUPPINEN, V. Some improvments in the production of *Bacillus stearothermophilus* spores for sterilization control. *Acta Pharm. Fenn.*, Helsink, v.91, p.75-83, 1982.

89. OLANDER, L., COLMSJÖ, A, HOLMBERG, B., KRANTZ, S., LANDSTRÖM, B. Occupational implications of the chlorofluorocarbon ban in sweden. *Am. J. Ind. Med.*, New York, v.19, n.6, p. 818-826, 1991.

90. OREMLAND, R.S., LONERGAN, D.J., CULBERTSON, C.W., LOVLEY, D.R. Microbial degradation of hydrochlorofluorocarbons 21 and 123 in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, n.5, p.1818-1821, 1996.

91. OXBORROW, G.S., KALLANDER, K.D., MENDENHALL, C.R. Biological indicators for ethylene oxide sterilization: performance evaluation. *J. Parent. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.37, n.1, p.13-14, 1983.

92. OXBORROW, G.S., PLACENCIA, A.M., DANIELSON, J.W. Effects of temperature and relative humidity on biological indicators used for ethylene oxide sterilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.45, n.2, p.546-549, 1983.

93. PHILLIPS, C.R., KAYE, S. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. I. Review. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, v.50, p.270-279, 1949.

94. PHILLIPS, C.R. The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. II. Sterilization of contamined objects with ethylene oxide and related compounds: time, concentration and temperature relationships. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, v.50, p.280-8, 1949.

95. PINTO, T.J.A. **Aspectos fundamentais na validação do monitor biológico para a esterilização por óxido de etileno**. São Paulo, 1991. 203p. (Tese de Doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).

96. PINTO, T.J.A., CRUZ, J.M. Estudo de estabilidade de monitores biológicos para esterilização por óxido de etileno. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v.77, n.2, p.68-70, 1996.

97. PINTO, T.J.A., CRUZ, J.M. Influência da natureza do suporte empregado para inóculo de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 na resistência do monitor biológico. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v.77, n.2, p.53-56, 1996.

98. PINTO, T.J.A., SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno. I. Influência do meio de esporulação na resistência dos esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.26, n.6, p.379-383, 1992.

99. PINTO, T.J.A., SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno. II. Influência de corpos de prova no desempenho de monitores biológicos e sua avaliação. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.26, n.6, p.384-391, 1992.

100. POPP, W., VAHRENHOLZ, C., PRZYGODA, H., BRAUKSIEPE, A., GOCH, S., MÜLLER, G., SCHELL, C., NORPOTH, K. DNA-protein cross-links and sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes and hydroxyethyl mercapturic acid in urine of ethylene oxide-exposed hospital workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.66, n.5, p.325-332, 1994.

101. REICH, R.R., MORIEN, L.L. Influence of Environmental Storage Relative Humidity on Biological Indicator Resistance, Viability, and Moisture Content. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.43, n.3, p.609-614, 1982.

102. RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., RIOS, A.C.C., COSTA, S.L., TATES, A.D., TORNQVIST, M., NATARAJAN, A.T. Biological monitoring of workers occupationally exposed to etylene oxide. *Mut. Res.*, Amsterdam, v.313, p.81-87, 1994.

103. RIES, M.D., WEAVER, K., BEALS, N. Safety and efficacy of ethylene oxide sterilized polyethylene in total knee arthroplasty. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, Philadelphia, n.331, p.159-163, 1996.

104. ROWLAND, F.S. Stratospheric ozone in the 21st century – the chlorofluorocarbon problem. *Environ. Sci. Technol.*, Washington, v.25, n.4, p.622-628, 1991.

105. ROWLAND, F.S. Stratospheric ozone depletion by chlorofluorocarbons. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Weinheim, v.35, n.16, p.1786-1798, 1996.

106. ROWLAND, F.S., ALDRICH, D.G. Chlorofluorocarbons, stratospheric ozone and the antartic "ozone hole". *Environ. Cons.*, Lausane, v.15, n.2, p.101-115, 1988.

107. RUSSEL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 1ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982. 653p.

108. RUSSEL 3^0, J.M., LUO, M., CICERONE, R.J., DEAVER, L.E. Satellite confirmation of the dominance of chlorofluorocarbons in the global stratospheric chlorine budget. *Nature*, London, v.379, n.6565, p.526-529, 1996.

109. RUTALA, W.A. Disinfection and sterilization of patient-care itens. *Inf. Control Hosp. Epidemiol.*, Slack, v.17, n.6, p.377-384, 1996.

110. RUTALA, W.A.,GERGEN, M.F., WEBER, D.J. Evaluation of a rapid readout biological indicator for flash sterilization with three biological indicators and three chemical indicators. *Inf. Control Hosp. Epidemiol.*, Thorofare, v.14, n.7, p.390-394, 1993.

111. RUTALA, W.A., JONES, S.M., WEBER, D.J. Comparison of a rapid readout biological indicator for steam sterilization with four conventional biological indicators and five chemical indicators. *Inf. Control Hosp. Epidemiol.*, Thorofare, v.17, n.7, p.423-428, 1996.

112. SARTO, F., TORNQVIST, M.A., TOMANIN, R., BARTOLUCCI, G.B., OSTERMAN-GOLKAR, S.V., EHRENBERG, L. Studies of biological and chemical monitoring of low-level exposure to ethylene oxide. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v.17, n.1, p.60-64, 1991.

113. SCHULTE, P.A., WALKER, J.T., BOENIGER, M.F., TSUCHIYA, Y., HALPERIN, W.E. Molecular, cytogenetic, and hematologic effects of

ethylene oxide on female hospital workers. *J. Occup. Environ. Med.*, Baltimore, v.37, n.3, p.313-320, 1995.

114. SHINTANI, H. The relative safety of gamma-ray, autoclave and ethylene oxide gas sterilization of the thermosetting polyurethane. *Biom. Instrument. Technol.*, Philadelphia, v.29, n.6, p.513-519, 1995.

115. SHINTANI, H. Factors in the preparation of Biological Indicators that affect the decimal reduction time. *Biom. Instrument. Technol.*, Philadelphia, v.30, n.5, p.449-453, 1996.

116. SHINTANI, H., TAHATA, T., HATAKEYAMA, K., TAKAHASHI, M., ISHII, K., HAYASHI, H. Comparison of D10-value accuracy by the limited spearman-karber procedure (LSKP), the stumbo-murphy-cochran procedure (SMCP), and the survival-curve method (EN). *Biom. Instrument. Technol.*, Philadelphia, março/abril, 1995.

117. SIDEBOTTOM, H., FRANKLIN, J. The atmospheric fate and impact of hydrochlorofluorocarbons and chlorinated solvents. *Pure Appl. Chem.*, London, v.68, n.9, p.1757-1769, 1996.

118. SLEPECKY, R., FOSTER, J.W. Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.78, p.117-23, 1959.

119. SOUZA, S., AKKARA, J.A., KAPLAN, D.L. Effects of freon 113 on the survival of bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.63, n.6, p.559-564, 1987.

120. SPICHER, G. Design of monitors and monitoring systems for validation and cycle control. In: **Workshop on biological monitoring of sterilization**. London: Eucomed, 1986. p.111-139.

121. STEELMAN, V.M. Ethylene oxide: the importance of aeration. *Assoc. Oper. Room Nurses AORN J.*, Chicago, v.55, n.3, p.773-785, 1992.

122. SZOPINSKI, F.G., PUSKAR, M.A., HECKER, L.H. Field validation of three passive dosimeters for excursion limit monitoring of ethylene oxide. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.52, n.4, p.151-157, 1991.

123. TALLENTIRE, A. Quantitative aspects of microbiological controls in industrial sterilization. In: GAUGHRAN, E.R.L., KERELUK, K., eds. **Sterilization of medical products**. New Jersey: Johnson & Johnson, 1977. p.69-86.

124. TROCHIMOWICZ, H.J. Industrial research on alternative fluorocarbons. *Toxicol. Letters*, Amsterdan, v.68, p.25-30, 1993.

125. Union Carbide. **Ethylene oxide**. Danbury: Editora, 1987. p. 1-10 [Product Information Bulletin, 7-92].

126. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 19ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1975. p. 710-711.

127. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 20ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1980. p. 1038-1039.

128. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 23ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.200-206, 1846-1849, 1976-1981.

129. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 24ed. Rockville; United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.1811-1813

130. VERRAES, S., MICHEL, O. Occupational asthma induced by ethylene oxide. *Lancet*, London, v.346, n.8987, p.1434-1435, 1995.

131. VESLEY, D., NELLIS, M., ALLWOOD, P.B. Evaluation of a rapid readout biological indicator for 121^{0}C gravity and 132^{0}C vacuum-assisted

steam sterilization cycles. *Inf. Control Hosp. Epidemiol.*, Thorofare, v.16, n.5, p.281-286, 1995.

132. VESSONI PENNA, T.C. **Validação de processos de esterilização: I. conceitos básicos.** São Paulo: Laes & Haes, 1994. n.88, p.46-48.

133. VINK, P., PLEIJSIER, K. Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers. *Biomaterials*, Guildford, v.7, p.225-230, 1986.

134. ZHU, Z., MATTHEWS, I.P., DICKINSON, W. Specificity, accuracy, and interpretation of measurements of ethylene oxide gas concentrations during sterilization using a microwave spectrometer. *Rev. Scient. Instrum.*, New York, v.68, n.7, p.2883-2890, 1997.

135. WALLHÄUSSER, K.H. Sterilization. In: REHM, H.J., REED, G. **Biotechnology.** Weinheim, 1985. p.701-23.

136. WALLINGTON, T.J., SCHNEIDER, W.F., SEHESTED, J., NIELSEN, O.J. Hydrofluorocarbons and stratospheric ozone. *Faraday Discussions*, Cambridge, v.100, p.55-64, 1995.

137. WASHIDA, N., IAMAMURA, T., BANDOW, H. Experimental studies of ozone depletion by CFCs, BFCs, HCFCs and CH_3Br using a 6-m^3 photochemical chamber. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Tokyo, v.69, n.3, p.535-541, 1996.

138. WELCH, K.L. Ozone depletion: is the sky falling? *Western J. Med.,* San Francisco, v.160, n.4, p.364-365, 1994.

139. WEST, K.L. Ethylene oxide sterilization: a study of resistance relationships. In: GAUGHRAN, E.R.L., KERELUK, K., eds. **Sterilization of medical products.** New Jersey: Johnson & Johnson, 1977. p. 109-168.

140. WESTER, R.C., HARTWAY, T., SERRANZANA, S., MAIBACH, H.I. Human skin *in vitro* percutaneous absorption of gaseous ethylene oxide from fabric. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v.35, n.5, p.513-515, 1997.

141. WUEBBLES, D.J., KINNISON, D.E. Predictions of ozone changes. *Int. J. Environ. Studies*, London, v.51, n.3, p.269-283, 1996.

8. RESUMO

Tendo em vista a importância do processo esterilizante aplicado a produtos farmacêuticos e aos produtos médico-hospitalares, distintos métodos foram desenvolvidos de forma a possibilitar sua aplicação, inclusive a materiais termossensíveis. Neste contexto,o processo que se tornou mais amplamente empregado consiste naquele utilizando o óxido de etileno. Este agente, devido às características de inflamabilidade e explosividade, tem sido usado diluído em gases inertes, predominantemente os clorofluorcarbonos (CFCs), que contornam tais problemas. Conhecimentos recentemente adquiridos e consenso internacional quanto ao risco da depleção da camada de ozônio da estratosfera ocasionaram a busca de alternativas, dentre as quais a adoção dos hidroclorofluorcarbonos (HCFCs). O delineamento do presente trabalho objetivou a comparação da eficácia esterilizante de misturas de óxido de etileno em CFC 12 (Oxyfume 12^R), e em HCFCs 22 e 124 (Oxyfume 2002^R), quando aplicadas em diferentes concentrações (450 mg/L e 600mg/L) e sob distintas temperaturas (45^{0}C, 55^{0}C e 65^{0}C). Procedeu-se a desafios subletais (3, 6 ,9, 12 e 15 minutos de exposição), empregando a cada ciclo seis indicadores biológicos laboratorialmente preparados, com esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 obtidos em garrafas de Roux contendo meio de esporulação, sendo a seguir padronizados, inoculados em suportes celulósicos e acondicionados em embalagens filme-papel, perfazendo um total de 1080 monitores. Paralelamente foram também submetidos a desafios indicadores biológicos de aquisição comercial (Attest^R 1264, 3M), dois a cada ciclo, perfazendo 360 unidades. Os resultados de resistência obtidos (valor D) nos 180 ciclos privilegiaram estes últimos, levando tal resultado a considerações quanto ao procedimento de purificação da suspensão de esporos e diferenças

existentes entre suportes e acondicionamentos empregados. A eficácia esterilizante de ambas as misturas, Oxyfume 12[R] e Oxyfume 2002[R], revelou-se equivalente, mesmo em diferentes concentrações. Além de observações que evidenciaram os efeitos significantes quanto à preparação dos indicadores biológicos, foi evidente e estatisticamente significante (p=1%) o efeito do aumento da temperatura, promovendo efeito mais intenso sobre a letalidade dos esporos. Numa outra abordagem, de conotação ocupacional, procedeu-se também no decorrer do trabalho experimental à monitoração do ambiente quanto a resíduos de óxido de etileno, usando bomba e tubos de detecção da Dragüer[R]: os resultados obtidos nas diferentes posições e momentos, inferiores a 1 ppm, proporcionaram a conclusão de que, respeitando a adoção dos conceitos de engenharia indicados na Portaria Interministerial nº 482 de 16 de abril de 1999, publicada no Diário Oficial da União do dia 19 do mesmo mês e ano, é obtida condição compatível com a presença humana. É portanto gratificante que se possa concluir o trabalho com o sentimento de que efetivamente se tenha constituído em contribuição no sentido de permitir a manutenção de emprego do processo esterilizante em pauta, conferindo segurança ao paciente no uso de produtos, sem entretanto comprometer a vida humana em nosso planeta.

9. SUMMARY

Taking into account the importance of the sterilization process applied to medicines and medical devices, different kinds of methods have been developed, also applicable to heat sensitive materials. Ethylene oxide is the process most widely applied to medical devices. Due its explosiveness and inflamability, it has been used associated to non active gases, wich inhibit these properties, mainly the chlorofluorocarbons (CFCs). Recent knowledge about ozone-depleting gases and an international consensus on the need of reducing their effects are promoting a search for alternative chemicals. From these, one of the most interesting are the hydrochlorofluorocarbons (HCFCs) which, besides having this role, can also be used as transitional compounds while more environmentally suitable compounds are not available. This paper aims to compare two ethylene oxide sterilization mixtures: Oxyfume 12^{R} (using CFC 12) and Oxyfume 2002^{R} (using HCFCs 22 and 124), under different concentrations (450mg/L and 600mg/L) and different temperatures (45^{0}C, 55^{0}C and 65^{0}C). To accomplish this procedure, sub-lethal challenges were performed (3, 6, 9, 12 and 15 minutes of exposition),in a total of 180 cycles, using six biological indicators per cycle prepared in a laboratory, in a total of 1080 units, as well as two others purchased from an American supplier (Attest^{R} 1264, 3M), in a total of 360 units. The former indicators were obtained using *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 in Roux bottles, innoculated on paper carriers and wrapped up on protective packaging. The posterior lethality study and D value calculation highlighted the highest resistance of Attest^{R} indicators in comparison with the laboratory ones. This can be explained by different levels of spores purification, alongside with the differences between the carriers and packaging used in both cases. The sterilizing efficacy of Oxyfume 12^{R} and Oxyfume 2002^{R} revealed

equivalent results, even in different concentrations. The influence of higher temperatures was efficient (p=1,0). Aiming at occupational safety, environmental monitoration was also performed related to ethylene oxide, using Dragüer^{R} detection tubes and foley pump. The results, obtained in different positions and moments under 1 ppm, confirmed that the engineering concepts indicated by the Portaria Interministerial n^{0} 482 from 16 april 1999, published on the 19th of the same month in the Diário Oficial, offer residual safe levels compatible with human presence. It is therefore gratifying to conclude that the sterilization process using Oxyfume 2002^{R} is both an efficient contribution to a safe utilization of products and, at the same time, to preserve the animal life on Earth.