

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

10/11/03
hos dias
1335 692
26036

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO POR ÓXIDO DE
ETILENO DE SUTURAS CIRÚRGICAS SINTÉTICAS ABSORVÍVEIS.**

ELIANA PAULA PEREIRA

Defesa para obtenção de título de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2003

•
1.6
36V

— BIBLIOTECA —
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO POR ÓXIDO DE
ETILENO DE SUTURAS CIRÚRGICAS SINTÉTICAS ABSORVÍVEIS.**

ELIANA PAULA PEREIRA

Defesa para obtenção de título de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2003

17649

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005516

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436v Pereira, Eliana Paula
Validação do processo de esterilização por óxido de
etileno de suturas cirúrgicas sintéticas absorvíveis /
Eliana Paula Pereira. -- São Paulo, 2003.
92p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Vessoni Penna, Thereza Christina

1. Esterilização industrial 2. Tecnologia químico-
farmacêutica 3. Microbiologia industrial I. T. II.
Vessoni Penna, Thereza Christina, orientador.

660.6

CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Eliana Paula Pereira

**VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO POR ÓXIDO DE ETILENO DE
SUTURAS CIRÚRGICAS SINTÉTICAS ABSORVÍVEIS.**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Therese Christina Vessoni Penna
Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
orientador/presidente

1º. examinador
Telma May Konito

2º. examinador
Adalberto Pessoa Junior

São Paulo, 13 de agosto de 2003.

*Para ser grande, sê inteiro.
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim, em cada lago a lua toda brilha, porque
alta vive.
(Fernando Pessoa)*

*Almir e Sueli,
adorados pais, pessoas únicas e iluminadas,
que nunca pouparam esforços para a minha
formação pessoal, espiritual e profissional.
Serei eternamente grata a vocês.*

*Cássio ('in memorian') e
Júnior ('in memorian'),
queridos irmãos, que sempre foram meus
exemplos de determinação e perseverança.*

*Rodrigo,
meu marido, grande cúmplice e companheiro
de todas as horas, incentivador incondicional
das minhas investidas. Sem sua compreensão
e ajuda nada teria sido realizado.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Thereza Christina Vessoni Penna, que além da oportunidade, fonte de inspiração profissional e orientação foi a minha maior colaboradora e aliada nesta empreitada.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda. que nunca me negou o necessário apoio e incentivo, liberando-me sem restrições para esta missão.

Ao Roberto, Carlos, Sônia, Rogélio e Íris pela incondicional confiança, amparo e permissão para que este trabalho se realizasse.

Aos amigos do EO pela amizade e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Microbiologia pela valiosa colaboração e companheirismo.

Aos amigos Borges, Alzira, Célia, Ângela, Carla, Roque, Nancy, Eb e Marina pela exaustiva ajuda, sugestões, carinho e incentivo em todos os momentos.

À amiga Fernanda cuja infinita paciência e habilidade contribuiu para a confecção deste trabalho.

À Ana Maida cujo conhecimento técnico permitiram a obtenção rápida das referências bibliográficas, bem como sua catalogação.

Aos dedicados funcionários das secretarias: Juarez, Mirian, Elza, Benê, Elaine e Jorge, que sempre atenderam aos mais variados pedidos da melhor forma possível.

A todos os demais funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., não nomeados, que contribuíram para o andamento deste trabalho.

Aos prestativos bibliotecários e funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Aos professores e funcionários das demais unidades de ensino que freqüentei neste campus, pela atenção e sorriso sempre presentes.

A todos, que ao longo destes meses de convivência, contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
NOMENCLATURA.....	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Óxido de etileno	6
3.1.1. Propriedades.....	6
3.1.2. Aplicações.....	8
3.1.3. Mecanismo de ação.....	9
3.1.4. Toxicidade.....	9
3.1.5. Fatores que influenciam a letalidade	10
3.1.5.1. Concentração do gás.....	11
3.1.5.2. Umidade relativa (UR)	12
3.1.5.3. Temperatura	13
3.1.5.4. Tempo de exposição.....	13
3.1.5.5. Outros fatores	14
3.2. A inativação microbiana em processo de esterilização por óxido de etileno	14
3.3. Esterilidade	16
3.4. Nível de garantia de esterilidade (SAL).....	17
3.5. Indicador biológico (IB).....	17
3.6. Validação do processo de esterilização	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Materiais	22
4.1.1. Sutura cirúrgica.....	22
4.1.2. Indicador biológico	23
4.1.3. Câmara de esterilização	25
4.1.3.1. Ciclo de esterilização	27
4.1.4. Carga de esterilização	30
4.1.5. Meios de cultura	31
4.1.5.1. Carga microbiana.....	31
4.1.5.1.1. TSA (Tryptic Soy Agar).....	31

4.1.5.1.2. Saboraud	31
4.1.5.2. Teste de esterilidade	31
4.1.5.2.1. TSB (Tryptic Soy Broth).....	31
4.1.5.2.2. THIO (Tioglicolato).....	31
4.1.6. Soluções	32
4.1.6.1. Carga microbiana.....	32
4.1.6.1.1. Água peptonada	32
4.1.6.1.2. Solução de ácido tartárico 10%	32
4.1.6.1.3. Solução de cloreto de sódio 10%	32
4.1.6.2. Óxido de etileno residual	32
4.1.6.2.1. Óxido de etileno	32
4.1.6.2.2. Nitrogênio.....	32
4.1.6.3. Umidade residual.....	33
4.1.6.3.1. Metanol anidro	33
4.1.6.3.2. Reagente Karl Fisher.....	33
4.1.7. Equipamentos / Vidrarias	33
4.1.7.1. Carga microbiana.....	33
4.1.7.2. Teste de esterilidade	33
4.1.7.3. Óxido de etileno residual	34
4.1.7.4. Umidade residual	34
4.2. Métodos	34
4.2.1. Qualificação microbiológica	34
4.2.1.1. Carga microbiana.....	34
4.2.1.2. Teste de esterilidade.....	37
4.2.1.3. Construção da curva de sobrevivência e determinação do valor de D	38
4.2.1.4. Método da sobremorte ou meio ciclo.....	39
4.2.2. Qualificação química.....	40
4.2.2.1. Análise de óxido de etileno residual	40
4.2.2.2. Análise de umidade residual.....	42
4.2.3. Qualificação dos parâmetros de processo	44
4.2.3.1. Concentração do óxido de etileno	44
4.2.3.2. Concentração de umidade relativa	45
4.2.3.3. Temperatura	46
4.2.3.4. Tempo	46
4.2.4. Análise estatística	47
4.2.4.1. Qualificação microbiológica	47
4.2.4.2. Qualificação química.....	47

4.2.4.2.1. Software	47
4.2.4.2.2. Plano amostral	47
4.2.4.2.3. Estatística descritiva.....	47
4.2.4.2.4. Estatística indutiva	48
4.2.4.3. Qualificação dos parâmetros de processo	48
4.2.4.3.1. Software	48
4.2.4.3.2. Estatística indutiva	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. Qualificação microbiológica	50
5.2. Qualificação química	54
5.2.1. Óxido de etileno residual	54
5.2.2. Umidade residual	55
5.3. Qualificação dos parâmetros de processo	57
5.3.1. Concentração do óxido de etileno	57
5.3.2. Concentração de umidade relativa	58
5.3.3. Temperatura	59
5.3.4. Tempo	63
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 : CURVA DE INATIVAÇÃO MICROBIANA	15
FIGURA 2 : SUTURA CIRÚRGICA SINTÉTICA ABSORVÍVEL.....	23
FIGURA 3 : INDICADOR BIOLÓGICO (<i>BACILLUS SUBTILIS</i> VAR. <i>NIGER</i>)	24
FIGURA 4 : ACONDICIONAMENTO DO INDICADOR BIOLÓGICO (<i>BACILLUS SUBTILIS</i> VAR. <i>NIGER</i>) EM EMBALAGENS DE SUTURA	25
FIGURA 5 : CÂMARA DE ESTERILIZAÇÃO	26
FIGURA 6 : CICLO DE ESTERILIZAÇÃO	27
FIGURA 7 : CARTA GRÁFICA DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO	29
FIGURA 8 : CONFIGURAÇÃO DA CARGA DE ESTERILIZAÇÃO E PONTOS DE AMOSTRAGEM	30
FIGURA 9 : FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE TESTE DA CARGA MICROBIANA.....	37
FIGURA 10 : FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE TESTE DE ESTERILIDADE	38
FIGURA 11 : FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ANÁLISE DE ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL .	42
FIGURA 12 : FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE UMIDADE RESIDUAL	44
FIGURA 13 : TERMOPAR E SEU POSICIONAMENTO NA CARGA	46
FIGURA 14 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA MICROBIANA DA SUTURA CIRÚRGICA SINTÉTICA ABSORVÍVEL	52
FIGURA 15 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DO INDICADOR BIOLÓGICO <i>BACILLUS SUBTILIS</i> VAR. <i>NIGER</i>.	53
FIGURA 16 : CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DO INDICADOR BIOLÓGICO <i>BACILLUS SUBTILIS</i> VAR. <i>NIGER</i> PELO MÉTODO DE SOBREMORTE OU MEIO CICLO	54
FIGURA 17 : CURVA DA CONCENTRAÇÃO DO EO (MG/L) NO INTERIOR DA CÂMARA DE ESTERILIZAÇÃO POR TEMPO (MIN).....	58
FIGURA 18 : TEMPERATURA (°C) X TEMPO (MIN) DURANTE A ETAPA DE EXPOSIÇÃO DOS 10 TERMOPARES - 1ª CORRIDA.....	60
FIGURA 19 : TEMPERATURA (°C) X TEMPO (MIN) DURANTE A ETAPA DE EXPOSIÇÃO DOS 10 TERMOPARES - 2ª CORRIDA.....	61
FIGURA 20 : TEMPERATURA (°C) X TEMPO (MIN) DURANTE A ETAPA DE EXPOSIÇÃO DOS 10 TERMOPARES - 3ª CORRIDA.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 : TESTES DE ESTERILIDADE DA SUTURA SINTÉTICA ABSORVÍVEL E DO INDICADOR BIOLÓGICO <i>BACILLUS SUBTILIS VAR. NIGER</i>	51
TABELA 2 : DADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA SUTURA SINTÉTICA ABSORVÍVEL E DO INDICADOR BIOLÓGICO <i>BACILLUS SUBTILIS VAR. NIGER</i>	52
TABELA 3 : VALOR D DO PRODUTO E DO BIOINDICADOR	53
TABELA 4 : RESULTADOS DOS CICLOS E SOBREMORTE UTILIZANDO-SE O INDICADOR BIOLÓGICO <i>BACILLUS SUBTILIS VAR. NIGER</i>	53
TABELA 5 : CONCENTRAÇÃO DO ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL DAS AMOSTRAS (PPM/PRODUTO).....	55
TABELA 6 : CONCENTRAÇÃO DA UMIDADE RESIDUAL DAS AMOSTRAS (μ G/PRODUTO)	56
TABELA 7 : CONCENTRAÇÃO DE EO (MG/L) NA CÂMARA DE ESTERILIZAÇÃO POR TEMPO (MIN).....	57
TABELA 8 : CONCENTRAÇÃO DA UMIDADE RELATIVA (%) NO INTERIOR DA CÂMARA DE ESTERILIZAÇÃO NOS TRÊS CICLOS.....	59
TABELA 9 : TEMPERATURA (°C) DURANTE A ETAPA DE EXPOSIÇÃO NOS 10 TERMOPARES - PENETRAÇÃO DE CALOR - 1º CORRIDA.....	60
TABELA 10 : TEMPERATURA (°C) DURANTE A ETAPA DE EXPOSIÇÃO NOS 10 TERMOPARES - PENETRAÇÃO DE CALOR - 2º CORRIDA	61
TABELA 11 : TEMPERATURA (°C) DURANTE A ETAPA DE EXPOSIÇÃO NOS 10 TERMOPARES - PENETRAÇÃO DE CALOR - 3º CORRIDA.....	62
TABELA 12 : TEMPO (MIN) DE EXPOSIÇÃO OBTIDO NOS TRÊS CICLOS.....	63

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: DISTRIBUIÇÃO NORMAL DOS DADOS DE ÓXIDO DE ETILENO RESIDUAL.....	73
ANEXO 2: DISTRIBUIÇÃO NORMAL DOS DADOS DE UMIDADE RESIDUAL	74
ANEXO 3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE EO (MG/L) NAS TRÊS CORRIDAS.	75
ANEXO 4: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA TEMPERATURA (°C) NAS TRÊS CORRIDAS.	76
ANEXO 5: PUBLICAÇÃO "ETHYLENE OXIDE STERILIZATION OF SURGICAL SUTURES MONITORED BY <i>BACILLUS SUBTILIS</i>"	77

NOMENCLATURA

atm	Atmosfera
µg	Micrograma
µl	Microlitro
CFC-12	Clorofluorcarbono-12
CO₂	Dióxido de carbono
EO, ETO e EtO	Óxido de etileno
HCFC	Hidroclorofluorcarbono
Hg	Mercúrio
IB	Indicador biológico
K	Kelvin
L	Litro
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m³	Metro cúbico
N₂	Nitrogênio
pol	Polegada
pH	Potencial hidrogênico
ppm	Parte por milhão
SAL	<i>Sterility assurance level</i>
STEL	<i>Short-term-exposure limit</i>
THIO	Tioglicolato
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TWA	<i>Time weighted average</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

U	Unidade de massa molecular
UR	Umidade relativa
V	Volume

RESUMO

Quando um produto entra em contato com tecidos ou fluidos do corpo humano é imprescindível que este seja estéril e, portanto submetido previamente a um processo de esterilização antes do seu uso no paciente. O óxido de etileno tem sido empregado como um agente esterilizante em razão do seu amplo espectro microbicida e da sua compatibilidade com uma variedade de materiais sensíveis às altas temperaturas, à umidade e à radiação ionizante. Um processo de esterilização é considerado eficiente quando este resulta em produtos em conformidade com suas especificações e requisitos de qualidade.

Este trabalho teve como objetivo a validação do processo de esterilização por óxido de etileno de suturas cirúrgicas sintéticas absorvíveis. Nas análises dos resultados, constatou-se que o processo de esterilização avaliado resultou em suturas com um SAL mínimo de 10^{-6} , que o *Bacillus subtilis var. niger* foi um indicador adequado no monitoramento da eficiência do processo, que os teores de umidade e óxido de etileno residual dos produtos se encontraram abaixo do especificado e que os parâmetros de processo (tempo, temperatura, umidade relativa, concentração de óxido de etileno) são reprodutíveis.

ABSTRACT

When a product is put in contact with tissues or sterile fluids of the human body it is essential that it be previously submitted to a sterilizing process before its use on the patient. Ethylene oxide has been employed as a sterilizing agent due to its broad microbicide spectrum and to its compatibility with a variety of materials sensitive to high temperatures, humidity and ionizing radiation. A sterilizing process is considered efficient when it results in products that conform to quality specifications and requirements. The objective of this study was to validate the sterilizing process via ethylene oxide of synthetic absorbable surgical sutures. Analysis of the results has shown that the present sterilizing process results in sutures with a minimum SAL of 10^{-6} , the *Bacillus subtilis var. niger* is an adequate indicator for monitoring process efficiency, product humidity and residual ethylene oxide levels are below specifications and that process parameters (time, temperature, relative humidity, ethylene oxide concentration) can be reproduced.

1. INTRODUÇÃO

A esterilização industrial apresenta-se como uma das mais desafiadoras fronteiras para o desenvolvimento de equipamentos e instrumentos de uso médico-hospitalar. Isto ocorre desde os primórdios do conhecimento científico da microbiologia e sua implicação nas infecções hospitalares e comunitárias. Já no século XIX, constatou-se que a eliminação dos microrganismos seria fundamental para assegurar a eficácia dos produtos médicos. Como consequência, os hospitais passaram a centralizar as atividades de controle microbiano, tanto assepsias quanto esterilização, as quais eram realizadas individualmente e a critério de cada equipe médica. Assim sendo, surgiram as primeiras “centrais de esterilização”, tendo sido empregados os métodos físicos disponíveis, como por exemplo, calor úmido e calor seco. Ainda no final do século XIX, um hospital municipal, nos Estados Unidos, já contava com sistema regular e rotineiro de autoclavagem a vapor para os seus instrumentos cirúrgicos, levando a uma redução inigualável dos índices de infecções e complicações pós-operatórias.

Com o infortúnio da primeira guerra mundial tornou-se evidente a necessidade da fabricação, em escala industrial, de produtos médicos. Os países que contavam com este apoio logístico perdiam menos combatentes e os feridos recuperavam-se mais rapidamente. Como nesta época, os materiais empregados eram basicamente o algodão, vidro e metal, as técnicas de esterilização não foram substancialmente afetadas, tendo continuado o largo emprego do calor úmido e calor seco.

A indústria desenvolveu-se e novos materiais passaram a estar disponíveis, principalmente, os versáteis e econômicos plásticos modernos. Tal resolução ganhou velocidade nas décadas de 1940 e 1950, esbarrando em um obstáculo tecnológico fundamental: Como esterilizar estes novos correlatos? Esta nova tecnologia deveria contar com um agente esterilizante eficaz à baixa temperatura, uma vez que a maioria dos plásticos era termosensíveis, o seu

uso não deveria demandar controles sofisticados, devido à intenção de uso também na área hospitalar, além de baixo custo e facilidade de suprimento

O óxido de etileno tornou-se o gás esterilizante de maior uso em razão da sua excelente difusão, capacidade de penetração nas embalagens e nos lumens dos correlatos, com propriedade bactericida, fungicida e esporicida, com rápida ação esterilizante, compatibilidade com uma ampla variedade de embalagens e materiais, ou seja, não causa alterações na aparência nem nas funções dos itens processados e dos materiais de embalagem mesmo após ciclos repetitivos, pode ser utilizado tanto em pequenas quanto em grandes instalações, é passível de monitoramento tanto com monitores químicos, físicos e microbiológicos apresentando ainda, um custo razoável para a instalação e operação de rotina (RUTALA, 1996 e JOSELYN, 2001).

Devido à florescente indústria petroquímica, ficou patente a conveniência do uso do óxido de etileno, como sendo este novo agente. Experiências prévias no início do século XX já haviam sido testadas, visando a conservação de alimentos e além do mais, o óxido de etileno era um intermediário na síntese de plásticos e detergentes. A escolha parecia conveniente, porém esbarrava em um ponto: sua elevada inflamabilidade, gerando risco concreto de explosividade. A solução adotada foi misturar ao novo agente esterilizante a um gás diluente, tendo sido empregado o clorofluorcarbono-12 (CFC-12), sem alterar as características esterilizantes do óxido de etileno.

Tudo parecia resolvido e o óxido de etileno passou a ser a técnica de escolha para a esterilização de produtos médicos de natureza plástica. Entretanto, estudos toxicológicos e ambientais realizados na década de 1960 e 1970 demonstraram que a nova técnica tinha como malefícios a emissão de clorofluorcarbono-12, danoso para a atmosfera, e a exposição ocupacional ao óxido de etileno, por parte dos elementos envolvidos com a central de esterilização. A consciência dos danos à camada de ozônio e dos riscos de mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade pressionaram a busca de melhorias tecnológicas para o uso seguro do óxido de etileno. Desta maneira novos gases diluentes foram testados, principalmente os reconhecidamente

inertes, como é o caso do nitrogênio. Por outro lado, sistemas de controle e contenção da emissão do óxido de etileno foram desenvolvidos e adotados para aplicação em escala industrial.

Estas novas tecnologias, porém, ainda não foram suficientemente descritas e divulgadas no setor hospitalar, o qual representa a maior fração do mercado consumidor de óxido de etileno brasileiro, para fins de esterilização. Deste modo, a maioria dos usuários desta tecnologia ainda emprega as ferramentas disponíveis na década de 1950, com visíveis prejuízos sociais, ambientais e econômicos.

Portanto, na medida em que publicações sejam produzidas, descrevendo tecnologias, cuidados com o uso, alternativas de novas misturas, sistemas de depuração, modelos cinéticos de inativação microbiana e melhorias no desempenho dos equipamentos, cada vez mais o uso do óxido de etileno, tornar-se-á seguro e eficaz. Dentre tais perspectivas, uma das mais relevantes é a validação da esterilização que deve ser vista como uma evolução qualitativa e quantitativa de um processo de esterilização garantindo que o mesmo resulte em produtos em conformidade com seus requisitos de qualidade e seguro para uso e consumo (BRUCH, 1993), minimizando-se, também a experimentação e os riscos de exposição ocupacional.

Atualmente, 45% dos produtos médicos fabricados no mundo são esterilizados por EO, sendo este o método de escolha de produtos constituídos de materiais incompatíveis com altas temperaturas, umidade e radiação (SORDELLINI, 1996 e MOSLEY *et al.*, 2002a).

Na literatura, a alta incidência de infecções foi atribuída ao uso de correlatos descontaminados inadequadamente, a qual veio enfatizar a necessidade de se estabelecer normas e procedimentos que regularizassem a atividade da esterilização (RUTALA, 1996).

Por esta razão, a partir de 1970 foram elaborados guias que regulamentavam a validação e rotina do processo de esterilização por óxido de etileno, culminando em 1994 com a publicação da norma internacional

“ANSI/AAMI/ISO 1135 - Medical devices validation and routine control of ethylene oxide sterilization”.

Como as características dos produtos não podem ser integralmente verificadas e garantidas por uma inspeção ou testes subseqüentes no produto final, o processo deve ser validado com um alto grau de confiabilidade.

A validação da esterilização por óxido de etileno é uma das mais complexas. Este processo é extremamente eficiente e pode ser realizado a partir de uma infinidade de combinações de parâmetros que afetam a eficácia da esterilização tais como concentração do gás EO, umidade, temperatura e tempo.

A validação deve demonstrar por meio de evidências documentais que a combinação selecionada dos parâmetros de processo resulta em produtos em conformidade com seus atributos de qualidade. Sua eficácia é verificada a partir da determinação do nível de garantia de esterilidade que o produto esterilizado atinge ao final do processo, da adequação do indicador biológico utilizado no monitoramento do mesmo, da concentração residual do EO e da umidade no produto e a reprodutibilidade dos parâmetros do processo que contribuem para a eficiência do mesmo (LINK & MACDONELL, 1997).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivos:

- ➡ Verificar a adequação do indicador biológico *Bacillus subtilis var. niger* no monitoramento da eficiência do processo de esterilização por óxido de etileno de suturas cirúrgicas, avaliando se sua resistência é igual ou superior à carga microbiana presente no produto, ou seja, na sutura cirúrgica sintética absorvível, por meio da comparação dos valores de D entre a carga microbiana do produto e do bioindicador;
- ➡ Verificar a letalidade do processo de esterilização por óxido de etileno através do método da sobremorte ou do meio ciclo;
- ➡ Verificar qual o nível de garantia de esterilidade *Sterility Assurance Level - (SAL)* atingido pela sutura cirúrgica sintética absorvível após o processo de esterilização por óxido de etileno;
- ➡ Verificar se o processo de esterilização resulta em suturas cirúrgicas que atendam aos seus requisitos químicos como de umidade e concentração óxido de etileno residual;
- ➡ Verificar a reprodutibilidade dos parâmetros do processo de esterilização fundamentais para a eficiência do mesmo, tais como, temperatura, tempo de exposição, concentração de óxido de etileno e umidade relativa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Óxido de etileno

3.1.1. Propriedades

O óxido de etileno (EtO, ETO ou EO) é membro da família dos éteres cíclicos. É um composto com fórmula molecular C_2H_4O , que pode também ser chamado de óxido de dimetileno, oxirano, oxireno, epóxido, epóxido-etano e óxido eteno. Sua massa molecular é de 44,05 U sendo, aproximadamente duas vezes mais pesado que o ar. A baixa temperatura, o óxido de etileno é um líquido incolor com ponto de ebulição de 10,4 °C. De odor detectável a partir de concentrações de 430 ppm, apresenta-se adocicado e semelhante ao éter. É completamente miscível tanto em água quanto em solvente orgânico tais como éteres e álcoois. Em pH ácido reage formando etilenoglicol e na presença de íons cloro forma a cloridrina etilênica (BURGESS & REICH, 1993).

O óxido de etileno é inflamável e potencialmente explosivo, embora no seu estado líquido estas condições requeiram temperaturas e pressão altas. No seu estado gasoso tal risco pode acontecer em concentrações de 3 a 100% por V/V no ar. Por causa destas suas características, o óxido de etileno é utilizado com gases inertes diluentes a fim de que tais misturas esterilizantes não atinjam a inflamabilidade e a explosividade (GILLIS, 1986).

O óxido de etileno é fornecido comercialmente na sua forma pura (100% EO) ou misturado a algum diluente gasoso para que seja formada uma mistura esterilizante. Os gases diluentes mais comumente utilizados incluem o clorofluorcarbono-12 (CFC-12), dióxido de carbono (CO_2) e recentemente o nitrogênio (N_2). É importante ressaltar que quando o EO está misturado a alguns destes gases, a capacidade bactericida se mantém quando comparado ao EO 100% (RUTALA & WEBER, 1998a).

Historicamente, a mistura 12% EO / 88% CFC-12 foi amplamente utilizada, principalmente, por causa da sua maior vantagem, ou seja, a sua

característica antinflamável e antiexplosiva. Além disso, a baixa pressão de vapor da mistura permite a transferência e armazenamento em cilindros ou tanques de baixa pressão. A adoção da mistura 12% EO / 88% CFC-12 requer menor diferencial de pressão a fim de obter a mesma concentração de operação de EO do que a mistura não inflamável com CO₂. O uso da mistura 12% EO / 88% CFC-12 foi originalmente favorecido em relação ao sistema 100% EO, uma vez que esta mistura permite investimento significativamente baixo em equipamentos e instalações em razão da sua propriedade não inflamável (ALFA *et al.*, 1998).

Como a 12% EO / 88% CFC-12, a mistura 10%EO /90%CO₂ também é considerada não inflamável. Em comparação com as outras misturas esterilizantes, o uso destas em aplicações industriais é limitada, principalmente por causa da alta pressão de vapor do CO₂ e da baixa porcentagem de volume de EO. A alta pressão de vapor do CO₂ também estabelece condições que favorecem a separação do EO e do gás diluente CO₂ no cilindro de armazenamento. Esta separação pode aumentar a possibilidade de obter uma mistura inflamável a medida que a porcentagem de EO aumenta , podendo levar a variações na concentração de EO na câmara de processamento e uma explosão. Uma outra desvantagem no uso do CO₂ como um gás diluente, é que este cria um ambiente ácido o qual pode acelerar a corrosão tanto do material quanto do equipamento e catalisar a formação de polímeros. De um ponto de vista produtivo, o uso da mistura 10%EO /90%CO₂ requer um diferencial de pressão operacional superior a três vezes e meia a da mistura 12% EO / 88% CFC-12 e dez vezes a do sistema 100% EO para atingir concentrações equivalentes. O alto diferencial de pressão necessário durante o processo pode ser incompatível com o produto, embalagem e equipamento (ALFA *et al.*, 1996).

O uso dos clorofluorcarbonos tem sido limitado em razão da sua potencial capacidade de diminuir a camada protetora de ozônio, contribuindo desta forma para o aumento da concentração de raios ultravioleta e conseqüente acréscimo da temperatura terrestre. A adoção do sistema 100% EO está associada diretamente com a construção de equipamentos e sistemas

auxiliares a prova de explosão e de custos indiretos necessários para utilizar e manter em segurança o agente esterilizante na sua forma pura, representando um investimento superior às demais alternativas. Estima-se que exista uma explosão ou incêndio anual para cada 100 instalações que utilizam EO 100%. Uma outra proposta de mistura esterilizante é o 10% EO / 90% hidroclorfluorcarbono (HCFC), a qual substituiria a mistura 12% EO / 88% CFC-12. O diluente HCFC é mais lábil que os clorofluorcarbonos e se dissocia antes de atingir na camada de ozônio, portanto a sua característica potencial de reagir com o ozônio é cinquenta vezes menor que os clorofluorcarbonos. A principal vantagem da mistura esterilizante 10% EO / 90% HCFC são as suas características não inflamáveis e antiexplosivas. É importante enfatizar que a mistura 10% EO / 90% HCFC é uma solução temporária para o problema da diminuição da camada de ozônio, uma vez que tal agente também será banido até o ano de 2030 (ALFA *et al.*, 1997 e RUTALA *et al.*, 1998b).

O uso da mistura esterilizante EO/N₂ é interessante, uma vez que esta diminui as características de inflamabilidade e explosividade do óxido de etileno puro. O nitrogênio não representa qualquer risco ocupacional nem ambiental, sendo compatível com todos os correlatos uma vez que este é inerte e o seu custo é baixo (ELLIS, 1990).

3.1.2. Aplicações

Em razão das suas propriedades bactericida, fungicida e esporicida, o óxido de etileno tem sido utilizado desde a segunda guerra mundial na esterilização de artigos médico-hospitalares, uma vez que este também é compatível à natureza físico-química dos materiais termo, higro e radio sensível (CHRISTENSEN & KRISTENSEN, 1979). O seu principal uso industrial é no setor da petroquímica leve, onde é aplicado na síntese de fibras de poliéster, embalagens e filmes plásticos. O óxido de etileno chegou até a ser utilizado na agricultura no controle de pragas (KERELUK *et al.*, 1970).

3.1.3. Mecanismo de ação

A sua atividade antimicrobiana deve-se à alquilação de componentes celulares nucleofílicos, tais como os grupos amino, fenólicos, sulfidril e carboxila. Nas células vegetativas ou esporos bacterianos, a substituição do hidrogênio por um grupo hidroxietil ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$) pode levar à interrupção ou término de atividades metabólicas e reprodutivas, resultando em danos e morte celular. Evidências experimentais indicam que a reação primária do EO se dá com os ácidos nucléicos, causando a perda da capacidade reprodutiva do microrganismo (CAPUTO & ROHN, 1982).

3.1.4. Toxicidade

Apesar das características esterilizantes ideais apresentadas pelo óxido de etileno, alguns sintomas como dor de cabeça, náusea, vômito, dispnéia, e irritação respiratória foram relatados como consequência da inalação do vapor do gás esterilizante por humanos. Os efeitos de exposições repetidas a baixas concentrações do agente não estão bem documentados, porém casos reportados indicam que tais exposições podem estar associadas aos efeitos neurológicos como cefaléia, letargia, apatia e neuropatia senso motora (JORKASKY, 1990).

Estudos epidemiológicos sugerem uma relação entre o aumento da incidência de câncer de pâncreas, de estômago, de mama, leucemia e doença de Hodgkins e a exposição ocupacional crônica ao EO (RODICKS & BROWN, 1990).

O Ministério da Saúde considera o EO um agente potencialmente mutagênico, carcinogênico e teratogênico e de acordo com a portaria interministerial nº 482 de abril de 1999, estabeleceu-se um limite máximo de exposição ocupacional de 1 ppm para TWA (*time weighted average* – período de oito horas de trabalho por dia) e 5 ppm para STEL (*short-term-exposure limit*

– período de quinze minutos diários) . Já o limite máximo permitido de resíduos de óxido de etileno em correlatos após os processo de esterilização, reesterilização ou reprocessamento é de 250 ppm (AAMI-10993-7,1995; BRASIL, 1999 e MANNINIG, 1989). Relatos atestam que a concentração do EO residual acima dos limites em produtos médicos causa lesões cutâneas e hemólise (ZAYEVA *et al.*, 1990). A remoção residual do óxido de etileno em produtos é normalmente realizada em câmaras de aeração com lavagens múltiplas de ar que pode ser aquecido. As análises de detecção do gás em produtos ou ambientes são realizadas a partir de cromatografia gasosa. No monitoramento ocupacional são utilizados os métodos do tubo de carvão e difusão.

Devido às suas características tóxicas, o uso inadequado do óxido de etileno pode gerar riscos tanto para o paciente de um artigo médico-hospitalar, quanto para o usuário de outros produtos descontaminados por este método. Além disso, as equipes envolvidas no manuseio de equipamentos que empregam o EO, também podem correr perigos desnecessários, caso as precauções de segurança não sejam adotadas.

O conhecimento dos riscos potenciais decorrentes das características inerentemente tóxica do óxido de etileno não deve ser razão de temor, mas sim de conduzir à adequação de instalações assim como o uso de equipamentos de proteção individual que permitam condições de trabalho seguras (PINTO, 1997).

3.1.5. Fatores que influenciam a letalidade

Existem quatro parâmetros de processo que afetam diretamente a inativação dos microrganismos pelo óxido de etileno que são os seguintes: concentração do gás, temperatura, umidade relativa e tempo (PARISI, 1981).

3.1.5.1. Concentração do gás

As concentrações de óxido de etileno obtidas durante os ciclos dos processos industriais ficam normalmente entre 300 e 1200 mg/L. Concentrações inferiores a 300 mg/L, não contém moléculas de EO suficientes para fornecer um processo eficiente em um tempo hábil. O uso de concentrações acima de 1200 mg/L não propiciam uma redução significativa no tempo do processo que justifiquem quantidades adicionais do gás, embora, mais moléculas levem a um processo mais eficiente. Um processo de esterilização que utiliza 1200 mg/L de EO é duas vezes mais rápido do que um de 600 mg/L do gás e este por sua vez é duas vezes mais veloz do que o de 300 mg/L de EO.

Porém, considerando o custo do EO e os problemas de resíduos de gás no produto, os processos geralmente são realizados em concentrações menores. A concentração mais indicada deve ser estabelecida em função das características dos produtos, seu poder de absorção, letalidade do processo e da integridade das embalagens, pois, pressões elevadas podem danificá-las. Além disso, o EO deve estar em contato com o produto a ser esterilizado, o que é consequência da permeabilidade da embalagem ao gás ou da sua disposição. As concentrações mais usuais estão entre 400 – 600 mg/L de gás (GILLIS, 1986; BURGESS & REICH, 1993; HUCKER *et al.*, 2001 e SMITH, 2001).

O controle na concentração do gás no interior da câmara pode ser feito através de pressostato, de cromatógrafo gasoso, detector infravermelho ou pelo diferencial de peso do cilindro que contém o óxido de etileno, antes e após o processo de esterilização (SORDELLINI, 1997 e SMITH, 2001).

3.1.5.2. Umidade relativa (UR)

A umidade é um dos parâmetros de maior importância no processo de esterilização por óxido de etileno, sem uma umidade adequada o processo será bastante desfavorecido. Na prática, a concentração de umidade relativa na câmara de esterilização mais freqüente é de 40-80%, porém, depende dos produtos e embalagens a serem submetidos ao processo o valor a ser adotado. É importante ressaltar que a UR em excesso pode promover o aparecimento de resíduos de etilenoglicol e até mesmo danificar o produto a ser esterilizado. Existe uma série de investigações a respeito dos teores de umidade e sua influência na letalidade do processo. Os valores de D variam em até dez vezes quando a UR da câmara de esterilização oscila de 0-40% a 600 mg/L de EO e 54,4 °C (WHITBOURNE & REICH, 1979).

Uma umidade insuficiente pode gerar um processo com até cinco vezes mais tempo do que com uma umidade adequada. Existem várias razões pelas quais a umidade relativa tem um pronunciado efeito no potencial esterilizante do EO. Primeiramente, a água mostrou ser necessária na alquilação, reagindo com o gás, abrindo o seu anel epóxido e permitindo, desta forma, que o mesmo interaja com os componentes celulares nucleofílicos. Uma outra função é a facilitação na transferência do gás através de materiais polares. Foi observado também que a UR hidrata os materiais protéicos presentes nas superfícies celulares o que expõe mais os sítios de ativação, permitindo que a alquilação do gás ocorra mais rapidamente (GILLIS, 1986; BURGESS & REICH, 1993; HUCKER *et al.*, 2001 e SMITH, 2001).

A concentração interna de umidade relativa da câmara pode ser verificada a partir de higrômetros, volumetria (diferença de volume de água gasto na geração do vapor) e pressostato.

3.1.5.3. Temperatura

Os processos industriais, em sua maioria, adotam faixa de temperatura de 38-60 °C. Este parâmetro exerce uma das mais significativas influências na eficiência do óxido de etileno como agente esterilizante, ou seja, a cada aumento de 10 °C na temperatura, a taxa de inativação de esporos em geral duplica. Foi observado também, que o aumento da temperatura pode facilitar a transferência do EO para o produto e embalagem uma vez que aumenta a permeabilidade em certos materiais (GILLIS, 1986; BURGESS & REICH, 1993; HUCKER *et al.*, 2001 e SMITH, 2001).

A realização de estudos de penetração de calor nos produtos é importante, uma vez que explicam falhas de processo e evitam danos aos produtos e embalagens em pontos de super aquecimento. A temperatura é verificada apenas com a utilização de sensores.

3.1.5.4. Tempo de exposição

Existe uma relação direta entre os três parâmetros anteriores (concentração do gás, umidade relativa e temperatura) e o tempo requerido para que a letalidade desejada seja atingida. A seleção dos melhores parâmetros de processo resultará em processo de esterilização por óxido de etileno com duração inferior a duas horas (GILLIS, 1986 e BURGESS & REICH, 1993).

O início da exposição deve ser considerado somente quando todos os parâmetros atingirem o mínimo definido para o processo. A verificação do tempo do processo é realizada e medida diretamente.

3.1.5.5. Outros fatores

Os demais fatores que influenciam a letalidade do óxido de etileno são o produto a ser esterilizado e sua carga microbiana, a composição do material da embalagem e composição da carga a ser esterilizada bem como da densidade, além das condições de pré-condicionamento e aeração (lavagem do gás) (BURGESS & REICH, 1993).

3.2. A inativação microbiana em processo de esterilização por óxido de etileno

A inativação microbiana de uma população homogênea é considerada logarítmica, equivalente à cinética química de uma reação de primeira ordem. O fenômeno da inativação microbiana pode ser representado pelo modelo de curva linearizada, semilogarítmica de sobreviventes. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição resulta em curva linearizada decrescente, conforme figura 1. A variação do número de sobreviventes com o tempo de exposição é em função do número de organismos inicialmente presentes e é representada pela equação:

$$\log N_f = \log N_0 - \left(\frac{k}{2,303} \right) t, \text{ onde:}$$

$\log N_f$ - é o logaritmo decimal da população sobrevivente após um tempo (t) de exposição;

$\log N_0$ - é o logaritmo decimal da população no tempo inicial (t = 0);

k - é a constante de velocidade específica de destruição por unidade de tempo (t).

Para um mesmo microrganismo todos os parâmetros de processo devem ser mantidos constantes durante o tempo de exposição estabelecido, pois a resistência é em função da concentração de óxido de etileno, umidade e temperatura presentes (MACHMERTH, 1998).

Para o modelo de curva semilogarítmica de sobreviventes, o tempo necessário para destruição de 90% da população microbiana é o intervalo de tempo exigido para a curva percorrer um ciclo logarítmico. O intervalo de tempo de redução decimal (valor de D) é o principal parâmetro de avaliação das características de resistência da população microbiana.

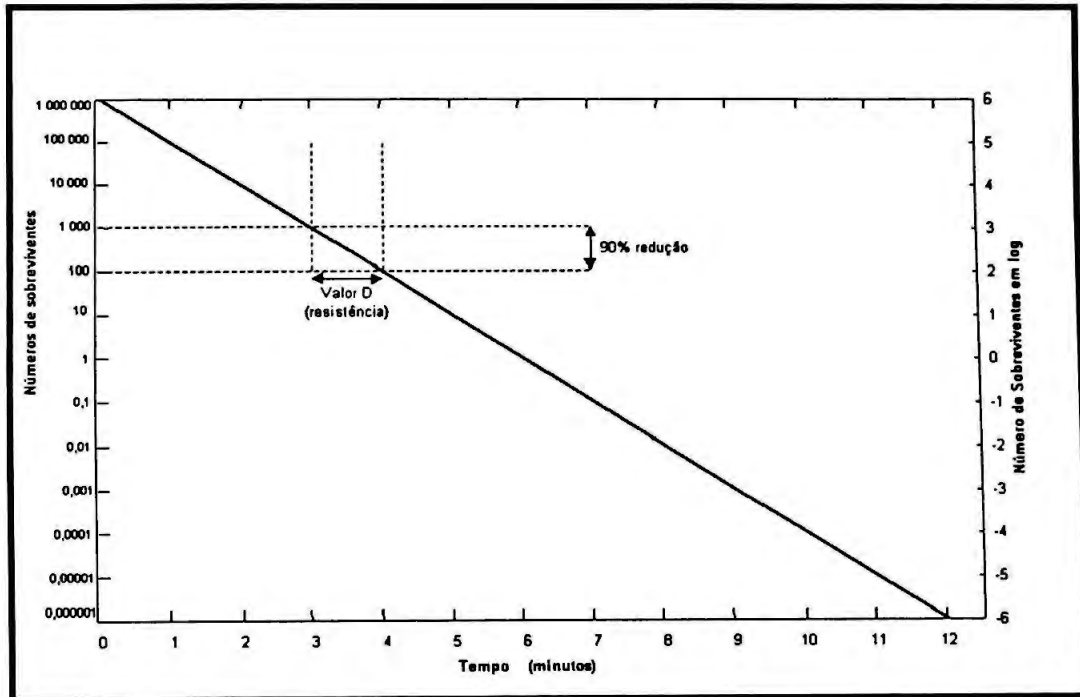


FIGURA 1 : Curva de inativação microbiana

O valor de D ou tempo de redução decimal é o intervalo de tempo nas condições de gases (EO e UR) e temperatura constantes para uma redução de 90% da população microbiana inicialmente presente no produto. O valor de D é o inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta calculada utilizando-se o método da regressão linear, através de mínimos quadrados, aplicado à região linear da curva de sobrevivência (PENNA, 1997).

3.3. Esterilidade

Em adultos saudáveis o contato com produtos contaminados não representa problema sério a menos que o microrganismo seja um patógeno. Entretanto, pode ocorrer infecção ou até óbito em se tratando de paciente com o sistema imunológico debilitado, ou se o produto se destinar à introdução em área normalmente estéril, pele lesada, membrana, mucosa ou olhos. O risco de infecção e/ou óbito depende de fatores, dentre os quais as características qualitativa e quantitativa do microrganismo, resistência do hospedeiro e via de administração. Por esta razão, uma série de processos utilizando-se agentes químicos e físicos foi desenvolvida para inativar microrganismos atingindo desta forma a esterilidade.

O conceito de esterilidade segundo PINTO *et al.*, (2000) refere-se a total ausência de forma viável capaz de reprodução. Com o conhecimento atual estatístico envolvendo a morte microbiana, há questionamentos quanto à afirmação absoluta da esterilidade dos produtos. Para abordarmos este assunto é importante definir previamente o conceito de morte associado aos microrganismos. Um microrganismo é definido como morto quando não mais se prolifera em meios de cultura onde usualmente isto ocorreria, considera-se como forma de constatação a turbidez de meios líquidos ou o surgimento de colônias em meios sólidos. Um único organismo deve ser capaz de se proliferar através de muitas gerações para ser detectado, portanto um microrganismo que não possa se reproduzir, ou que possa fazê-lo apenas por poucas gerações, pode por este critério, ser considerado morto. Como consequência direta dos fatos apresentados anteriormente, a expressão "livre de formas demonstráveis de vida" tem sido empregada como sinônimo de estéril.

Outra consideração a ser feita é que microrganismos expostos a agentes letais não morrem simultaneamente. O seu número decresce exponencialmente com o tempo de exposição, portanto a ausência de todos os microrganismos viáveis irá ocorrer num tempo infinito de exposição ao agente. A esterilidade é,

portanto um estado absoluto que não pode ser atingido e que não pode ser garantido.

O problema associado com a estrita definição de esterilidade tem conduzido ao desenvolvimento de conceitos e definições que expressam o nível de eficácia obtido com determinado processo esterilizante. Para produtos farmacêuticos e correlatos a denominação de estéril é geralmente atribuída aos produtos que, após a finalização do processo esterilizante, itens individuais apresentam a probabilidade de estarem não estéreis, ou um nível de garantia de esterilidade ou *Sterility Assurance Level* (SAL), igual ou superior a 10^{-6} (USP, 2002), ou seja, esta é a definição de esterilidade como uma função probabilística, onde em cada um milhão de unidades pode haver um produto não estéril.

3.4. Nível de garantia de esterilidade (SAL)

O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população microbiana de um produto define o seu nível de esterilidade ou *Sterility Assurance Level* (SAL). O nível de segurança do processo define a probabilidade de falha prevista para a operação, estabelecendo o número final de sobreviventes por unidade de produto (PENNA, 1997).

Na esterilização de produtos médicos recomenda-se um fator de segurança de esterilidade de 10^{-6} para materiais implantáveis, ou seja, a probabilidade de encontrar unidades não estéreis é de uma em um milhão (BRUCH, 1993 e USP, 2002).

3.5. Indicador biológico (IB)

Embora o conceito de esterilidade seja simples e direto, a verificação da esterilidade é mais complexa. A incapacidade dos testes de esterilidade de produtos finais em detectar baixos níveis de contaminação mesmo com uma

quantidade significativa de amostras é sabida desde meados da década de 70. Por esta razão, as indústrias de produtos médico-hospitalar passaram a fazer o uso de indicadores biológicos (IB), a fim de obter informações a respeito da eficiência e probabilidade de sobreviventes provenientes de processos de esterilização (GRAHAM & BORIS, 1993).

O indicador biológico pode ser definido como uma unidade contendo uma concentração microbiana conhecida com resistência (valor de D) a um determinado agente esterilizante podendo-se estimar a sua taxa morte quando exposto a certos parâmetros físicos e/ou químicos conhecidos. O bioindicador é uma suspensão de esporos bacterianos, que pode ser seca em um veículo adequado ou colocada diretamente em algumas amostras dos produtos a serem esterilizados. A destruição deste controle microbiológico positivo fornece um excelente argumento em relação à eficácia do processo de esterilização de produtos (GASPAR *et al.* 2002).

O ideal é que os organismos utilizados nos bioindicadores devam ter as suas resistências caracterizadas em termos de valores de D (OXBORROW *et al.* 1990). A destruição de uma população microbiana conhecida e de resistência definida (valor de D) quando comparada com a resistência (valor de D) de uma carga microbiana de um produto, permite uma estimativa razoável da probabilidade de sobrevivência (SAL) de um determinado processo de esterilização e a adequação do uso do IB na avaliação rotineira do ciclo de esterilização.

Esta simples filosofia por trás do uso de indicadores biológicos é que provém um controle mais rigoroso de um ciclo de esterilização do que a realização de teste de esterilidade em produtos finais. A vantagem do uso deste tipo de monitor é que eles têm a capacidade de integrar todos os fatores que impactam na morte biológica. O uso de bioindicadores é aceito pelos órgãos regulamentadores da área da saúde na garantia da esterilidade do produto como item de liberação do mesmo (CAPUTO & ROHN, 1982).

Os esporos bacterianos são de particular valor na esterilização em razão da sua alta resistência ao estresse físico e químico e por esta razão são

utilizados na confecção de indicadores biológicos. Em razão da resistência apresentada pelo *Bacillus subtilis var. niger* ao óxido de etileno, este é o bioindicador utilizado no monitoramento do processo de esterilização tanto para o agente mencionado anteriormente quanto para o calor seco (AAMI-11138-1, 1994 e AAMI-11138-2, 1994).

O bioindicador adequado deve apresentar uma resistência (valor de D) ao processo de esterilização igual ou superior àquelas dos microrganismos originalmente presentes no produto a ser esterilizado (AAMI-11135, 1994; AAMI-11138-1, 1994; AAMI-1138-2, 1994 e Penna, 1997).

3.6. Validação do processo de esterilização

A partir da década de 70, a terminologia e o conceito associados à validação do processo de esterilização se difundiram rapidamente e foram prontamente compreendidos e aceitos tanto pelas indústrias quanto pelos órgãos regulatórios. No processo de esterilização por óxido de etileno de correlatos a norma mais atual e que apresenta uma ampla abordagem do assunto é a "ANSI/AAMI/ISO 11135 - Medical devices validation and routine control of ethylene oxide sterilization" (AAMI – 11135, 1994).

A proposta da validação é assegurar com alto índice de confiança que o processo de esterilização resulta em produtos estéreis, indubitavelmente seguros e eficazes, atendendo integralmente aos seus requisitos de qualidade (PENNA, 1994). Isto se faz necessário quando nem todas as características do produto resultante de um processo podem ser integralmente verificadas e garantidas com testes e inspeções subseqüentes no produto final.

A validação do processo de esterilização por óxido de etileno é uma das mais complexas e dividem-se em qualificação de instalação, operação e processo a qual é subdividida química, microbiológica e em parâmetros de processo. A qualificação de instalação consiste na auditoria da câmara de esterilização e suas utilidades quando este foi instalado na planta, verificando se os mesmos se encontram de acordo com as recomendações do fabricante.

Na qualificação de operação é verificado se os parâmetros operacionais são atingidos e se os instrumentos se encontram calibrados. Já a qualificação de processo é realizada a fim de demonstrar a reprodutibilidade do processo a conformidade dos produtos com seus requisitos (SORDELINI & CAPUTO, 1996).

A qualificação de processo deve ser realizada sob as condições mais rigorosas do processo que às de rotina a fim de que se demonstre a adequação e reprodutibilidade do processo de esterilização. Os ciclos devem ser feitos com a carga máxima disponível, que apresente a maior densidade, dificuldade na penetração dos gases e requer mais dos equipamentos auxiliares.

A qualificação microbiológica verifica a determinação do nível de garantia de esterilidade que o produto atinge e a adequação do uso do bioindicador no monitoramento da eficácia do processo de esterilização.

Os métodos adotados na qualificação microbiológica são o da sobremorte ou meio ciclo e da construção da curva de sobreviventes a partir do método da fração de negativos ou da carga microbiana (enumeração) (AAMI-11737, 1994). O primeiro é, historicamente, o mais utilizado no processo de esterilização por óxido de etileno. Ele se baseia no conceito que o processo inativará 1×10^6 esporos de *Bacillus subtilis var. niger* na metade do tempo de exposição (meio ciclo). Portanto, no ciclo completo, o processo destruirá outros 1×10^6 esporos, havendo desta forma doze reduções logarítmicas e um SAL de 10^{-6} . Conforme a USP (2002), os bioindicadores para um ciclo de sobremorte tem que apresentar um valor de D mínimo de 2,6 minutos, uma condição de exposição de 600 ± 30 mg de EO/L, 52 ± 1 °C e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e ainda uma concentração maior ou igual a 10^6 de esporos.

Já a construção da curva de sobreviventes via fração de negativos ou enumeração visam à construção da curva de inativação microbiana tanto da carga microbiana presente no produto quanto do indicador biológico a partir da qual é possível verificar o valor de D e o SAL que o processo de esterilização proporciona ao mesmo.

Todos os parâmetros críticos do processo, incluindo a concentração do gás esterilizante, a umidade relativa e a temperatura são utilizadas nos seus valores mínimos permitidos para se estabelecer a pior condição de letalidade.

No processo de esterilização por óxido de etileno mesmo que o método da sobremorte (meio ciclo) seja empregado, é necessário obter dados que garantam que a resistência da carga microbiana presente no produto não seja maior que a do indicador biológico (AAMI-111135, 1994 e BRITISH STANDARD, 1994).

O conceito referenciado no parágrafo anterior é bastante importante no processo EO, uma vez que há muitas variáveis associadas à morte microbiana.

Em razão da dificuldade em obter e manter equipamentos de alta precisão e confiabilidade no monitoramento direto da concentração de gás EO e da umidade relativa presentes no processo de esterilização, um recurso utilizado é a verificação da reprodutibilidade do processo com a qualificação dos parâmetros do mesmo (BRUCH, 1993).

Porém, é na qualificação química que as concentrações residuais de óxido de etileno e de qualquer outro agente químico que apresente restrições quanto a sua concentração no produto será determinada e confrontada com os limites máximos permitidos (BURGESS & REICH, 1993).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Sutura cirúrgica

Conforme as farmacopéias brasileira e americana (FARM. BRAS., 1988 e USP, 2002) a sutura cirúrgica é dividida em absorvível e não absorvível conforme a capacidade do corpo humano em degradá-la ou não. O artigo médico-hospitalar utilizado neste trabalho foi uma sutura cirúrgica sintética absorvível a qual é passível de degradação e conseqüente absorção por parte de tecidos vivos.

A sutura sintética absorvível em questão é obtida a partir de um copolímero de glicolida e caprolactonato e um corante violeta de comprovada inocuidade (a coloração tem a finalidade de facilitar a visualização da sutura no campo operatório), para ser utilizado na aproximação de bordas de incisões. Após o implante da sutura, a sua absorção se dá por hidrólise através da água contida nos tecidos. A condição de esterilidade deste produto médico é considerada indispensável uma vez que seu emprego é em procedimento cirúrgico geral com a finalidade de aproximar ou ligar tecidos macios, onde se pretende obter uma cicatrização e recuperação dos tecidos envolvidos com posterior absorção do fio pelo organismo.

A sutura cirúrgica é composta pelo fio, agulha e uma embalagem de papel que acomoda os dois componentes anteriormente descritos sendo ainda, que estes são acondicionados numa embalagem de alumínio com abertura para permitir a penetração do gás esterilizante, conforme mostra a figura 2.

Conforme o inciso IV do artigo 4º da lei nº 5.991/73, do Ministério da Saúde, a sutura cirúrgica está classificada como correlato, ou seja, “a substância, produto, aparelho ou acessório não enquadrado nos conceitos anteriores, cujo uso ou aplicação esteja ligado à defesa e proteção da saúde individual ou coletiva, à higiene pessoal ou de ambientes, ou a fins diagnósticos e analíticos, os cosméticos e perfumes, e ainda os produtos dietéticos, óticos,

de acústica médica, odontológicos e veterinários” (BRASIL, 1973). A Resolução nº 185, de 22 de outubro de 2001, publicada no Diário Oficial da União de 06 de novembro de 2001, da atual Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define o termo “produto médico”, não utilizando mais o “correlato” o qual se caracteriza por “produto para saúde, tal como equipamento, aparelho, material, artigo ou sistema de uso ou aplicação médica, odontológica ou laboratorial, destinado à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utiliza um meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos, podendo entretanto ser auxiliado em suas funções por tais meios.”

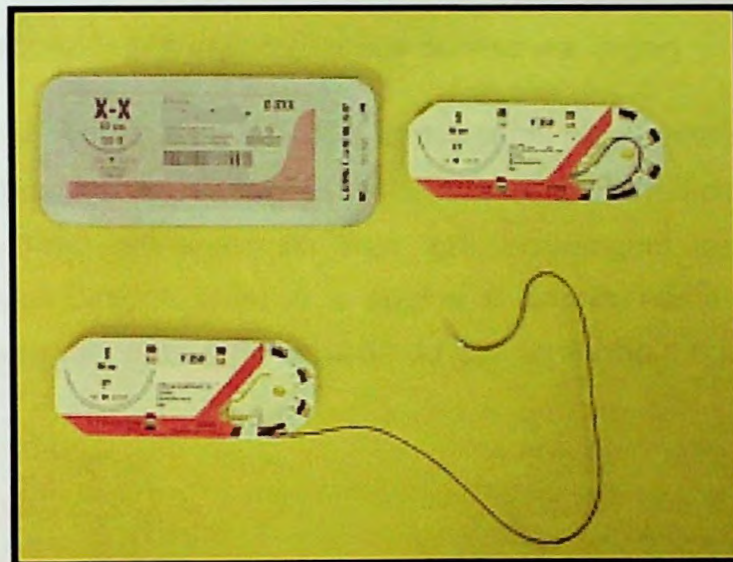


FIGURA 2 : Sutura cirúrgica sintética absorvível

4.1.2. Indicador biológico

O indicador biológico utilizado foi o *Bacillus subtilis var. niger* (ATCC N° 9372) a uma concentração de $3,62 \times 10^6$ de esporos por unidade, fornecido pela STERIS-SPORDEX, USA, com um valor de D de 4 minutos, a 600 ± 30 mg de

óxido de etileno/Oxyfume por litro, 50-70% de umidade relativa e 52 ± 1 °C de temperatura.

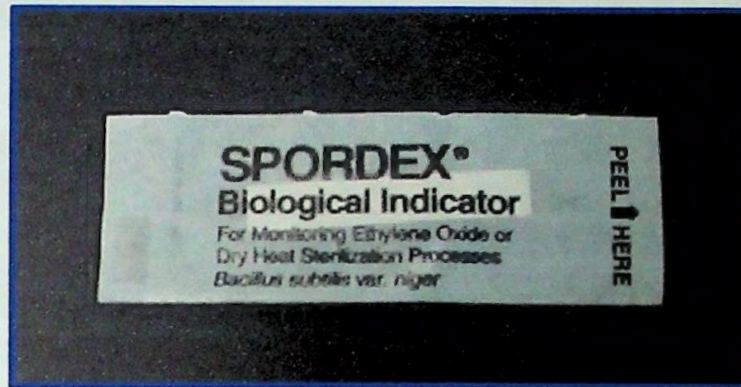


FIGURA 3 : Indicador biológico (*Bacillus subtilis* var. *niger*)

Para a construção da curva de sobreviventes bem como a realização dos ciclos da sobremorte, os indicadores biológicos foram acondicionados como se fossem as suturas cirúrgicas, ou seja, em embalagem de papel, a qual normalmente acondiciona o fio e a agulha e depois numa embalagem de alumínio com abertura para a penetração do gás conforme a figura 4.

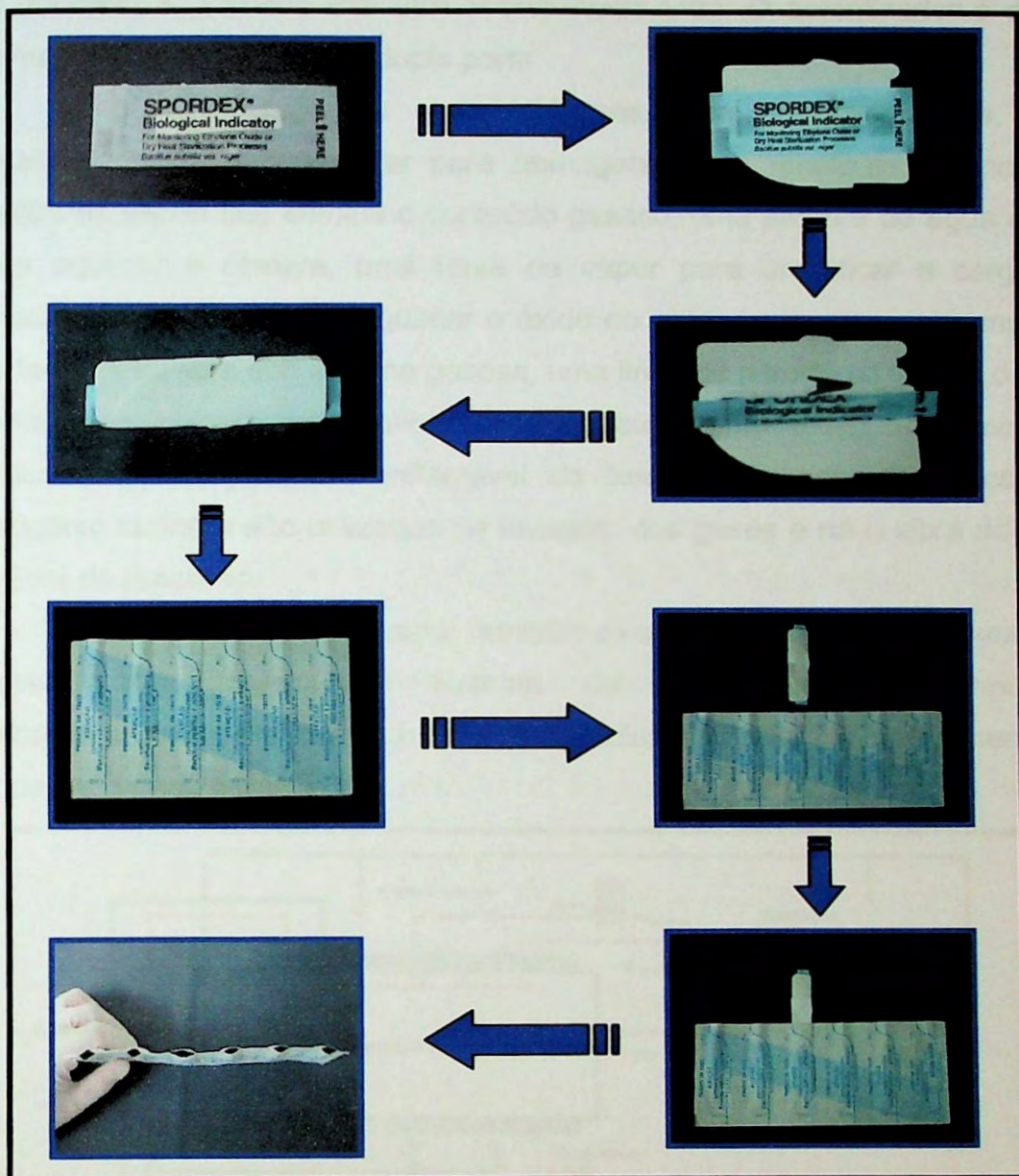


FIGURA 4 : Acondicionamento do indicador biológico (*Bacillus subtilis* var. *niger*) em embalagens de sutura

4.1.3. Câmara de esterilização

Os ciclos foram realizados na câmara de esterilização de processo de 2,63 m³ de volume interno (0,74m X 0,94m x 3,8m) da marca Quetzal localizada

na Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda. O esterilizador é do tipo comum, de aço inoxidável e dupla porta.

A câmara apresenta alguns sistemas auxiliares acoplados, como sistemas de circulação de ar para homogeneizar o ambiente interno, uma bomba de vácuo que elimina o conteúdo gasoso, uma jaqueta de água quente para aquecer a câmara, uma fonte de vapor para umidificar a carga, um volatilizador cuja função é aquecer o óxido de etileno para que o mesmo seja injetado na câmara sob a forma gasosa, uma linha de nitrogênio filtrado o qual é injetado na câmara previamente ao gás esterilizante a fim de eliminar as características explosiva e inflamável do óxido de etileno. As injeções de nitrogênio também são utilizadas na lavagem dos gases e na quebra do vácuo no final do processo.

Associados ao esterilizador também existem sensores de temperatura e pressão bem como um sistema de integração de computador, microprocessador e software os quais controlam, monitoram e documentam o processo de esterilização.

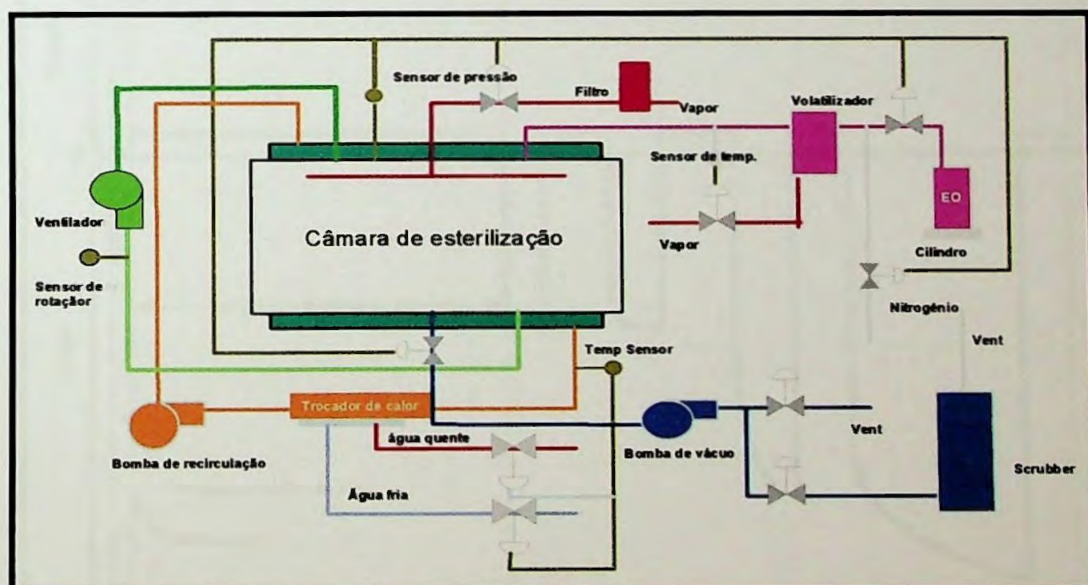


FIGURA 5 : Câmara de esterilização

4.1.3.1. Ciclo de esterilização

O ciclo de esterilização adotado apresenta duas fases bastante distintas no processo, ou seja, a etapa da esterilização e a de lavagem dos gases. É importante ressaltar que para diminuir a letalidade do processo na qualificação microbiológica, a concentração gasosa do óxido de etileno, umidade relativa, temperatura e tempo foram colocados nos parâmetros mínimos especificados de processo.

Já na qualificação química, os parâmetros de processo foram ajustados para que estes contribuíssem com as maiores concentrações de umidade e óxido de etileno residuais no produto final (pior caso), ou seja, tanto o vapor quanto o gás esterilizante ficaram nas suas pressões máximas permitidas bem como o maior tempo de contato dos mesmos com a carga. A temperatura ficou no seu limite mínimo para evitar a degradação do gás.

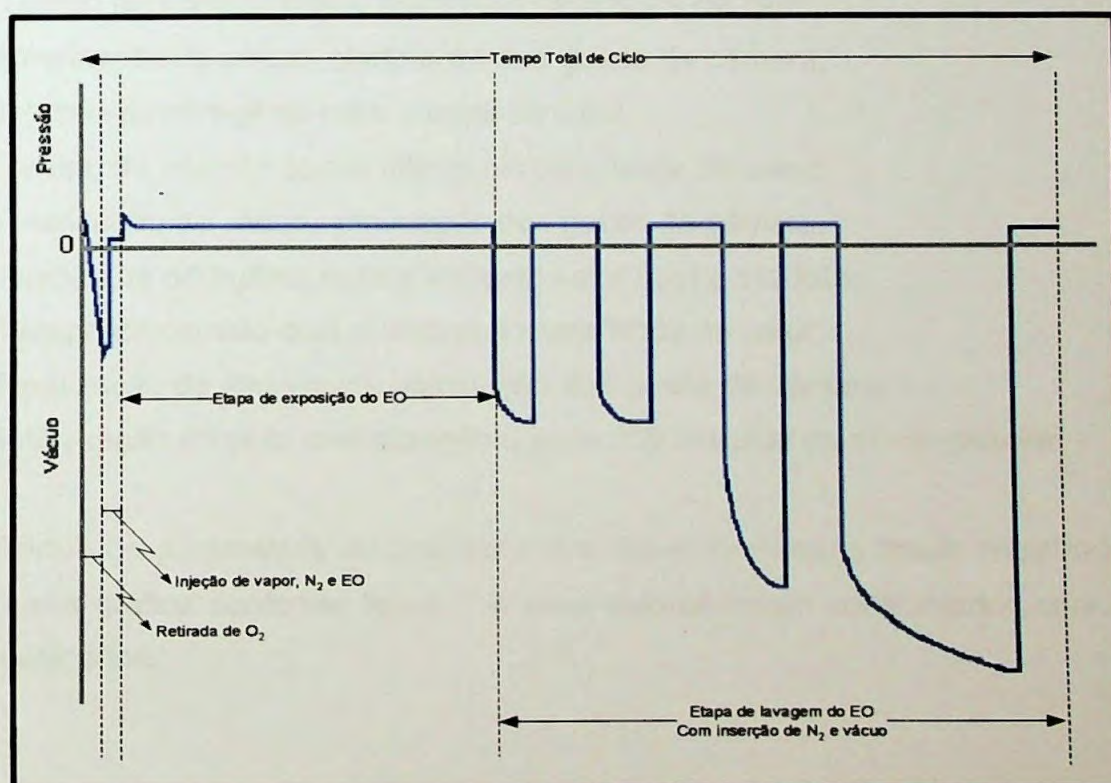


FIGURA 6 : Ciclo de esterilização

O ciclo de esterilização se resume nas seguintes fases:

- Aquecimento da câmara com a água quente recirculante da jaqueta;
- Realização de vácuo para a remoção de ar no interior da câmara;
- Injeção de vapor d'água para que a umidade relativa da câmara seja atingida;
- Injeção de nitrogênio para eliminar a inflamabilidade e explosividade do óxido de etileno;
- Injeção de óxido de etileno, ou seja, do agente químico esterilizante;
- O tempo de exposição da carga ao agente esterilizante (ação) é de no mínimo oito horas e máximo de nove horas;
- Aumento da temperatura da jaqueta;
- O processo de lavagem do gás EO e da retirada de umidade se inicia com a realização do vácuo;
- Injeção de nitrogênio para a troca de calor com o produto;
- Tempo de contato com o nitrogênio para troca de calor;
- Realização de vácuo, eliminação dos gases da câmara;
- Injeção de nitrogênio para a troca de calor;
- Tempo de contato com o nitrogênio para troca de calor;
- Realização de vácuo, eliminação dos gases da câmara;
- Injeção de nitrogênio para a troca de calor com o produto;
- Tempo de contato com o nitrogênio para troca de calor;
- Realização de alto vácuo, eliminação dos gases da câmara;
- Interrupção do ciclo com nitrogênio após 250 minutos da etapa anterior.

Todos os parâmetros de processo dos ciclos realizados foram registrados em carta gráfica conforme figura 7 e seus valores foram confrontados com os especificados.

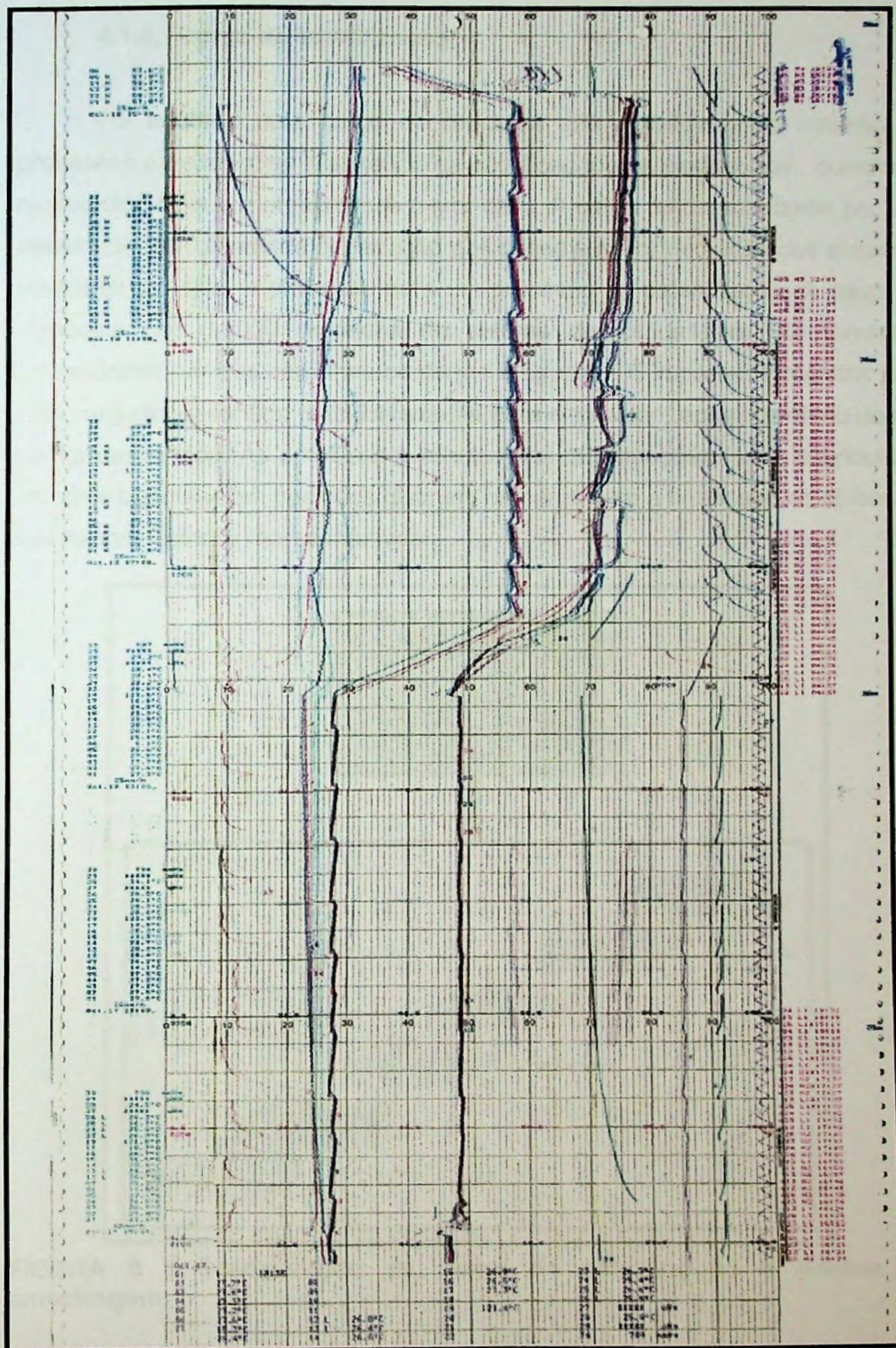


FIGURA 7 : Carta gráfica do processo de esterilização

4.1.4. Carga de esterilização

Foi adotada uma carga de produtos que desafiasse ao máximo os processos para se obter resultados na qualificação dos parâmetros, química e microbiológica que representasse o pior caso. A carga foi caracterizada por alta densidade, dificuldade de penetração dos gases e maior demanda dos sistemas auxiliares, ou seja, o pior caso para um processo de esterilização. A carga foi composta por 64.000 unidades de suturas distribuídas em 90 bandejas, acomodadas em três carrinhos conforme a figura 8. É importante registrar que esta carga foi destinada exclusivamente para o trabalho, após o término deste, ela foi descartada. As amostras avaliadas das qualificações foram distribuídas em vinte bandejas em posições distintas na carga com a finalidade de obtermos resultados bastante representativos.

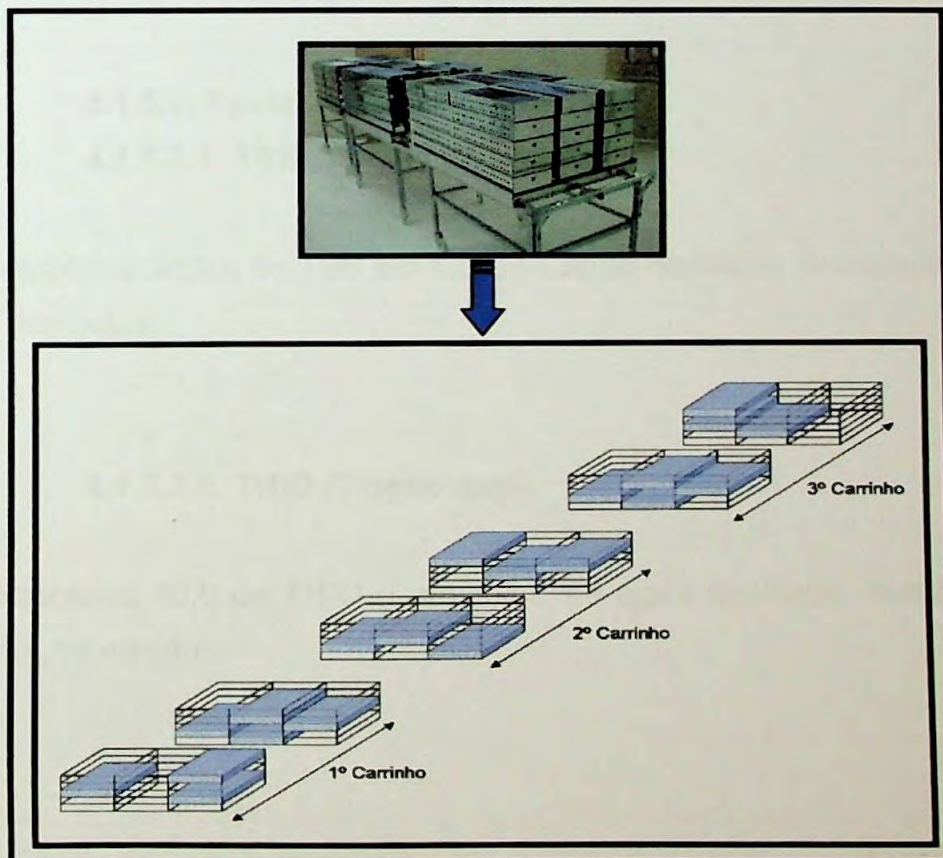


FIGURA 8 : Configuração da carga de esterilização e pontos de amostragem

4.1.5. Meios de cultura

4.1.5.1. Carga microbiana

4.1.5.1.1. TSA (Tryptic Soy Agar)

Dissolvido 24,0 g de TSA em 600,0 mL de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.5.1.2. Saboraud

Dissolvido 65,0 g de Saboraud em 1,0 L de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.5.2. Teste de esterilidade

4.1.5.2.1. TSB (Tryptic Soy Broth)

Dissolvido 30,0 g de TSB em 1,0 L de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.5.2.2. THIO (Tioglicolato)

Dissolvido 30,0 de THIO g em 1,0 L de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.6. Soluções

4.1.6.1. Carga microbiana

4.1.6.1.1. Água peptonada

Dissolvido 1,0 g de peptona em 1,0 mL de Tween-80® e estes em 1 L de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.6.1.2. Solução de ácido tartárico 10%

Diluído 10,0 g de ácido tartárico em 100,0 mL de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.6.1.3. Solução de cloreto de sódio 10%

Dissolvido 10,0 g de cloreto de sódio em 100,0 mL de água destilada. Autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

4.1.6.2. Óxido de etileno residual

4.1.6.2.1. Óxido de etileno

Óxido de etileno 100%, fornecido pela White Martins.

4.1.6.2.2. Nitrogênio

Nitrogênio super seco, fornecido pela White Martins.

4.1.6.3. Umidade residual

4.1.6.3.1. Metanol anidro

Solução de metanol anidro (MeOH anidro), ou seja, máximo de 200 µg de água/mL.

4.1.6.3.2. Reagente Karl Fisher

O reagente Karl Fisher é composto por uma mistura de metanol, carbonato de propileno, 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, dióxido de enxofre, 1,3-di-4-piridilpropano, dietanolazina, iodo, cloreto de colina e etilenoglicol.

4.1.7. Equipamentos / Vidrarias

4.1.7.1. Carga microbiana

- Balão volumétrico de 1 L;
- Tubos de ensaio de 260 mL;
- Pipetas de 30 mL;
- Placas de Petri de 90 mm de diâmetro;
- Agitador - modelo G10 GYROTORY, New Brunswick, USA;
- Incubadora - modelo B.O.D. MA415, Marconi, Brasil;
- Contador de colônias - modelo CP600, Phoenix, Brasil;
- Banho-maria - marca Fanen, Brasil.

4.1.7.2. Teste de esterilidade

- Fluxo laminar Pachane - modelo PA-116;
- Tubos de ensaio de 260 mL;

- Estufa - modelo 002CD, Fanen, Brasil;
- Incubadora - modelo B.O.D. MA415, Marconi, Brasil.

4.1.7.3. Óxido de etileno residual

- Seringa de 25 µl do tipo *gastight*;
- Frascos de vidro com capacidade para 10 mL;
- Cromatógrafo – modelo CG 5890, Hewlett Packard, USA;
- Estufa – modelo 515C, Fanen, Brasil.

4.1.7.4. Umidade residual

- Seringas do tipo *gastight* de 5 mL;
- Agitador orbital, Fanen, Brasil;
- Analisador de umidade - modelo CA05, Mitsubishi, Japão.

4.2. Métodos

4.2.1. Qualificação microbiológica

4.2.1.1. Carga microbiana

A carga microbiana da sutura cirúrgica foi realizada com trinta amostras antes do processo de esterilização. O valor obtido a partir deste método foi utilizado na construção da curva de sobrevivência com o tempo zero. É importante ressaltar que nenhum dos componentes da sutura sintética absorvível, comprovadamente apresenta propriedades bacteriostáticas e fungistáticas.

As amostras do produto foram subdivididas em fios e as embalagens que acomodam o fio e a agulha. Cerca de 25 g da embalagem e 30 fios foram

inseridos respectivamente em frascos contendo água peptonada (item 4.1.6.1.1.) com 475 mL e 300 mL e agitados por uma hora.

Para a contagem total de bactérias foram retiradas de cada frasco de extração alíquotas de 5 mL e colocadas em placas de Petri, previamente esterilizadas em réplicas de cinco. Foi vertido aproximadamente 20 a 25 ml de TSA (item 4.1.5.1.1.) estéril, resfriado e deixado solidificar. As placas foram posteriormente incubadas por 3 dias a 30-35 °C. Após tal período e utilizando-se um contador de colônias, as unidades formadoras de colônia presentes nas placas foram enumeradas.

Na contagem de bolores e leveduras, o procedimento acima foi repetido, ou seja, foram retiradas de cada frasco de extração alíquotas de 5 ml e colocadas em cinco placas de Petri, previamente esterilizadas, vertendo posteriormente, 20 – 25 ml de Saboraud (item 4.1.5.1.2.) e 0,2 mL de solução de ácido tartárico 10% (item 4.1.6.1.2.), estéreis e esfriados por placa e deixadas solidificar. As placas foram posteriormente incubadas invertidas por 7 dias a 20 – 25 °C. Após tal período e utilizando-se contador de colônias, as unidades formadoras de colônia presentes nas placas foram enumeradas.

Já na contagem de esporos mesófilos, foi retirada de cada frasco de extração uma alíquota de 20 a 25 ml e colocadas em tubos estéreis. Estes foram submetidos por 20 minutos a 100 °C e em seguida em banho de gelo por mais 20 minutos. Foram pipetadas 5 mL de cada tubo em cinco placas de Petri vertendo TSA (item 4.1.5.1.1.) liquefeito em seguida.

Foram aguardadas as solidificações das placas e posteriormente incubadas invertidas a 30 – 35 °C por 2 dias para obtenção do número de esporos mesófilos. Após tal período e utilizando-se um contador de colônias, as unidades formadoras de colônia presentes nas placas foram enumeradas.

Para a contagem de esporos termófilos, foram retirados de cada frasco de extração uma alíquota de 10 a 20 ml e colocadas em tubos estéreis. Estes foram submetidos por 10 minutos ao banho-maria e em seguida em banho de gelo por mais 20 minutos. Foram pipetadas 5 ml de cada tubo em cinco placas de Petri vertendo TSA liquefeito em seguida. Foram aguardadas as

solidificações das placas e posteriormente incubadas invertidas a 50 – 60 °C por 2 dias para obtenção do número de esporos termófilos. Após tal período e utilizando-se um contador de colônias, as unidades formadoras de colônia presentes nas placas foram enumeradas.

No isolamento de patogênicos foram retiradas de cada frasco de extração alíquotas de 10 ml e colocadas em tubos contendo em 120 mL de TSB (item 4.1.5.2.1.) com 10% de solução de cloreto de sódio (item 4.1.6.1.3.) para a verificação da presença de *Staphylococcus aureus*, 120 ml de TSB para verificação da presença de enterobactérias, (*Pseudomonas aeruginosa* ou *Cândida*) e em 120ml de Tioglicolato (item 4.1.5.2.2.) para a verificação da presença de *Clostridium*. Estas foram incubadas a 30 – 35 °C por 2 dias (USP, 2002). Após a incubação os tubos foram verificados quanto a ocorrência de crescimento (turvação).

A obtenção do valor total da carga microbiana foi feito da seguinte forma:

- Cálculo da massa ou número de unidades de produto por placa de contagem

Massa ou número de unidades de produto por placa de contagem = $(A/B) \times C$,
onde:

A = massa ou número de unidades de produto;

B = volume total de extração;

C = alíquota tomada

- Cálculo da quantidade de carga microbiana por unidade ou grama de produto

Carga microbiana do produto (UFC) = $\frac{(D \times E)}{F}$, onde:

D = 1 unidade ou 1g de produto;

E = quantidade de microrganismos isolados (UFC);

F = massa ou número de unidades de produto por placa de amostragem

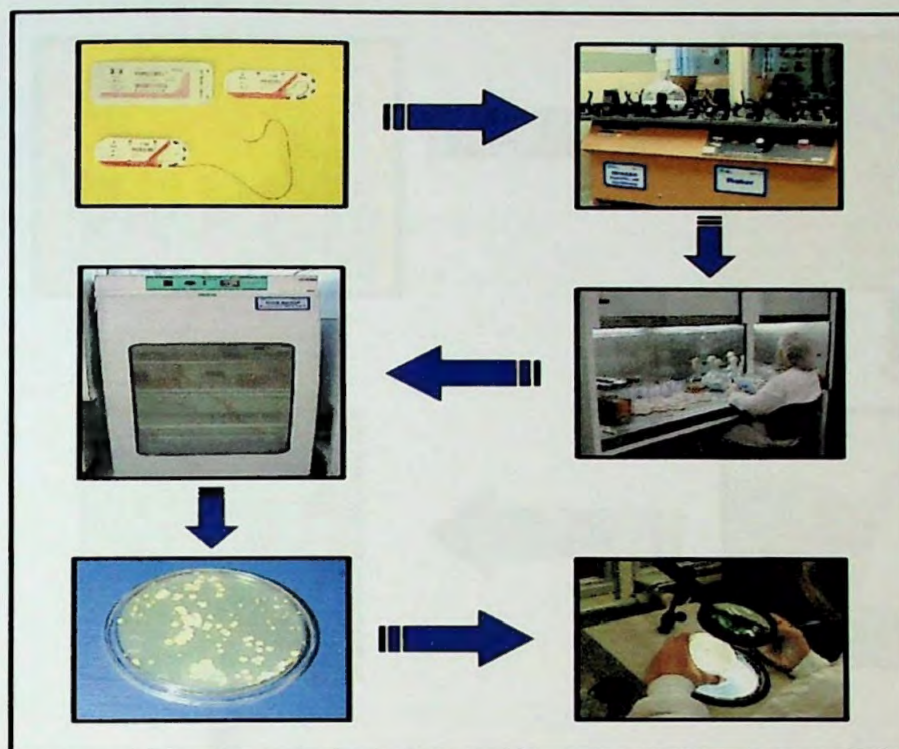


FIGURA 9 : Fluxograma do método de teste da carga microbiana

4.2.1.2. Teste de esterilidade

O teste de esterilidade adotado tanto para a sutura cirúrgica quanto para indicador biológico foi da inoculação direta conforme USP, 2002. Tais análises foram realizadas sob fluxo laminar.

As embalagens externas das suturas cirúrgicas foram abertas assepticamente e os produtos, com o auxílio de uma pinça foram transferidos para os tubos de ensaio contendo meios de cultura líquidos como o TSB (item 4.1.5.2.1.) e o THIO (item 4.1.5.2.2.), sendo estes incubados, respectivamente a 20-25 °C e 30-35 °C por um período de quatorze dias. Ao final destes dias os tubos foram avaliados se houve ou não o crescimento microbiano (turvação).

A metodologia para os indicadores biológicos foi igual à adotada para o produto, porém o meio de cultura utilizado foi apenas o TSB (item 4.1.5.2.1.), incubado a 30-35 °C por quatorze dias (USP, 2002).

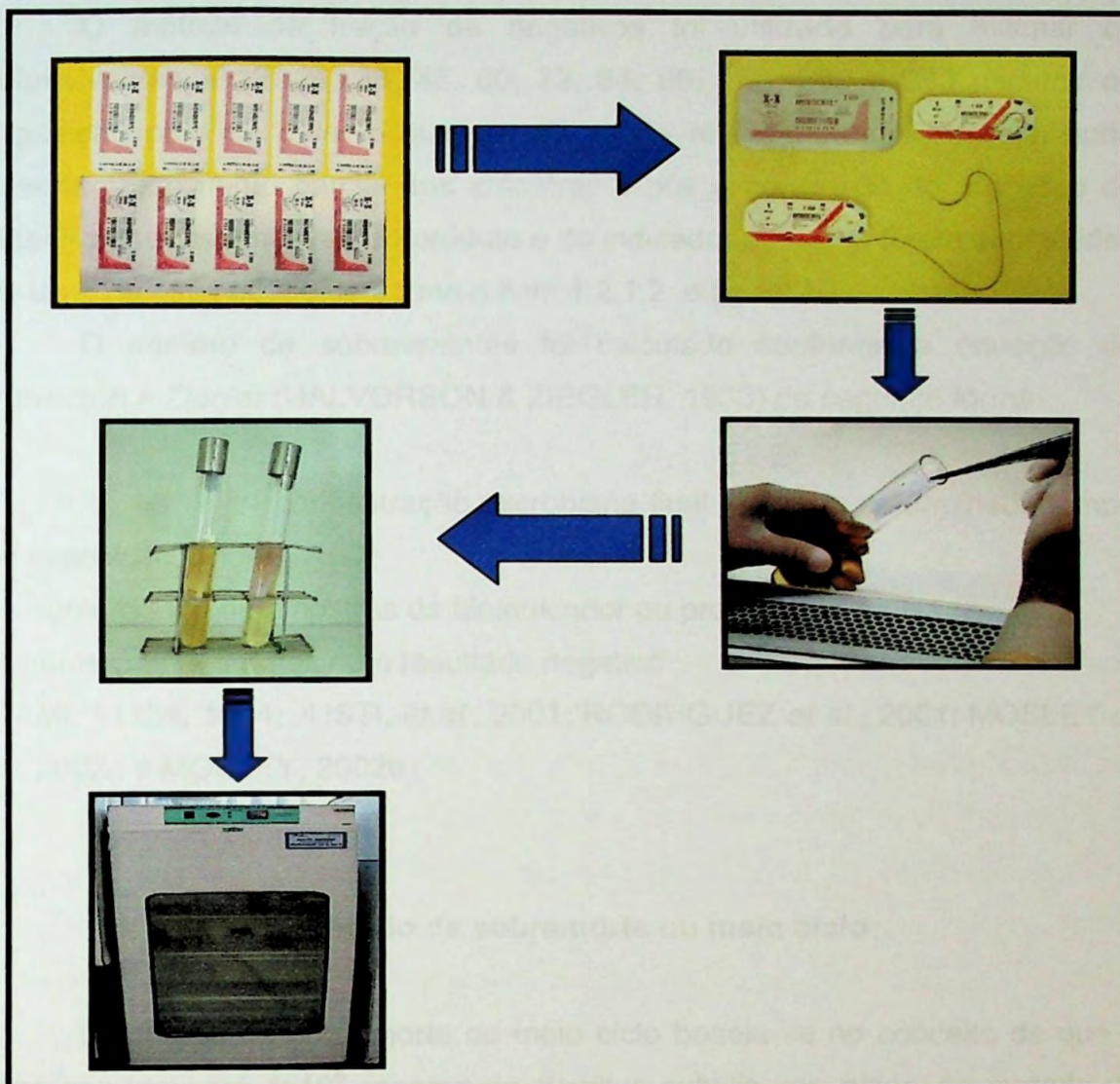


FIGURA 10 : Fluxograma do método de teste de esterilidade

4.2.1.3. Construção da curva de sobrevivência e determinação do valor de D

A curva de sobreviventes foi construída relacionando-se o logaritmo decimal dos sobreviventes em função do tempo de exposição ao agente esterilizante. O valor de D foi calculado a partir do inverso negativo do coeficiente angular da porção retilínea da curva de sobreviventes.

O método da fração de negativos foi utilizado para estimar os sobreviventes a 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 160, 200 e 240 minutos de exposição para se obter o que se chama de região quantal, ou seja, onde haveria crescimento parcial das amostras. Após a conclusão do processo de esterilização, as amostras do produto e do indicador biológico foram submetidas ao teste de esterilidade conforme o item 4.2.1.2. e figura 10.

O número de sobreviventes foi calculado conforme a equação de Halvorson e Ziegler (HALVORSON & ZIEGLER, 1933) da seguinte forma:

$N_u = 2,3 \log\left(\frac{n}{r}\right)$ - concentração microbiana final após um determinado tempo de exposição, onde:

n - número total de amostras de bioindicador ou produto utilizado

r - número de amostras com resultado negativo

(AAMI, 11135, 1994; JUSTI, *et al.*, 2001; RODRIGUEZ *et al.*, 2001; MOSLEY *et al.*, 2002a e MOSLEY, 2002b).

4.2.1.4. Método da sobremorte ou meio ciclo

O método da sobremorte ou meio ciclo baseia-se no conceito de que o processo inativará 1×10^6 esporos de *Bacillus subtilis var. niger* na metade do tempo de exposição (meio ciclo). Portanto, no ciclo completo, o processo destruirá outros 1×10^6 esporos, havendo desta forma doze reduções logarítmicas e um SAL de 10^{-6} .

Este método, historicamente, tem sido o mais utilizado nos processo de esterilização por óxido de etileno em razão da sua praticidade e reconhecimento normativo. Nesta metodologia foram empregados apenas indicadores biológicos os quais após o término do processo de esterilização são submetidos ao teste de esterilidade conforme item 4.2.1.2.. O critério de sucesso deste procedimento é que no final dos três meio ciclos do processo de esterilização não pode haver nenhum crescimento das amostras dos

indicadores biológicos utilizadas. É importante ressaltar que o ciclo de esterilização utilizado adota um tempo mínimo de exposição de 480 minutos, portanto, as três corridas foram realizadas com 240 minutos de exposição.

4.2.2. Qualificação química

4.2.2.1. Análise de óxido de etileno residual

O óxido de etileno residual é um termo utilizado para referenciar vestígios químicos, os quais podem permanecer associados aos correlatos até a sua utilização no paciente. A fim de que a sutura cirúrgica absorvível atenda aos requisitos residuais do óxido de etileno é necessário que este fique em quarentena por oito dias após o seu processo de esterilização.

O método analítico utilizado na determinação do óxido de etileno residual do produto em questão foi o do *headspace*, no qual o gás esterilizante ainda contido na amostra foi liberado por aquecimento, em frasco lacrado, à temperatura e tempo controlado. O gás liberado foi coletado em micro seringas e submetido à análise por cromatografia gasosa. A comparação dos resultados em relação à um padrão de concentração conhecida permitiu calcular o valor de óxido de etileno contido na amostra (PAGE, 1993 e AAMI-10993-7, 1995). O método será detalhado a seguir.

Na preparação do óxido de etileno padrão (item 4.1.6.2.1) foi utilizado três frascos de vidro lacrados utilizando septos de silicone, os quais foram saturados em capela com o gás esterilizante após quinze minutos de fluxo do gás. Utilizando-se uma seringa de 25 μL do tipo *gastight* foram retiradas alíquotas de 5, 10, e 20 μL e inseridas no cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama para a construção de uma curva padrão. Cada alíquota foi amostrada em triplicata.

Uma vez concluída a curva padrão foi iniciada a injeção das amostras. Porém, estas foram previamente preparadas a partir da transferência de 60 a 100 mg da sutura (sem agulha) para os frascos de vidro previamente pesados.

Estes foram pesados novamente após a introdução do fio, lacrados e em seguida submetidos ao aquecimento em estufa à temperatura de 100 ± 5 °C por quinze minutos. Após este período, os frascos foram retirados da estufa e coletadas alíquotas de 50 μ L e injetadas no cromatógrafo. Para cada amostra também foram realizadas triplicatas.

A concentração de óxido de etileno residual foi obtida utilizando-se a seguinte equação:

$$C_{EO} = \left(\left(\frac{A_a}{A_p} \right) \times \left(\frac{M_{EO}}{M_a} \right) \right), \text{ onde:}$$

C_{EO} = concentração de óxido de etileno residual em ppm

A_a = área cromatográfica da amostra

A_p = área média cromatográfica do padrão

M_{EO} = massa de óxido de etileno padrão = 7,32 μ g

M_a = massa da amostra

As condições do cromatógrafo gasoso na determinação do óxido de etileno residual estão descritas abaixo:

- Coluna empacotada de aço inox com 1,8 m de comprimento e 1/8 pol de diâmetro interno e enchimento Porapak R 80-100 *mesh*;
- Gás de arraste – nitrogênio;
- Fluxo – 60 μ L/min;
- Temperatura:
 - Injetor – 150 °C
 - Coluna – 250 °C
 - Detector – 280 °C

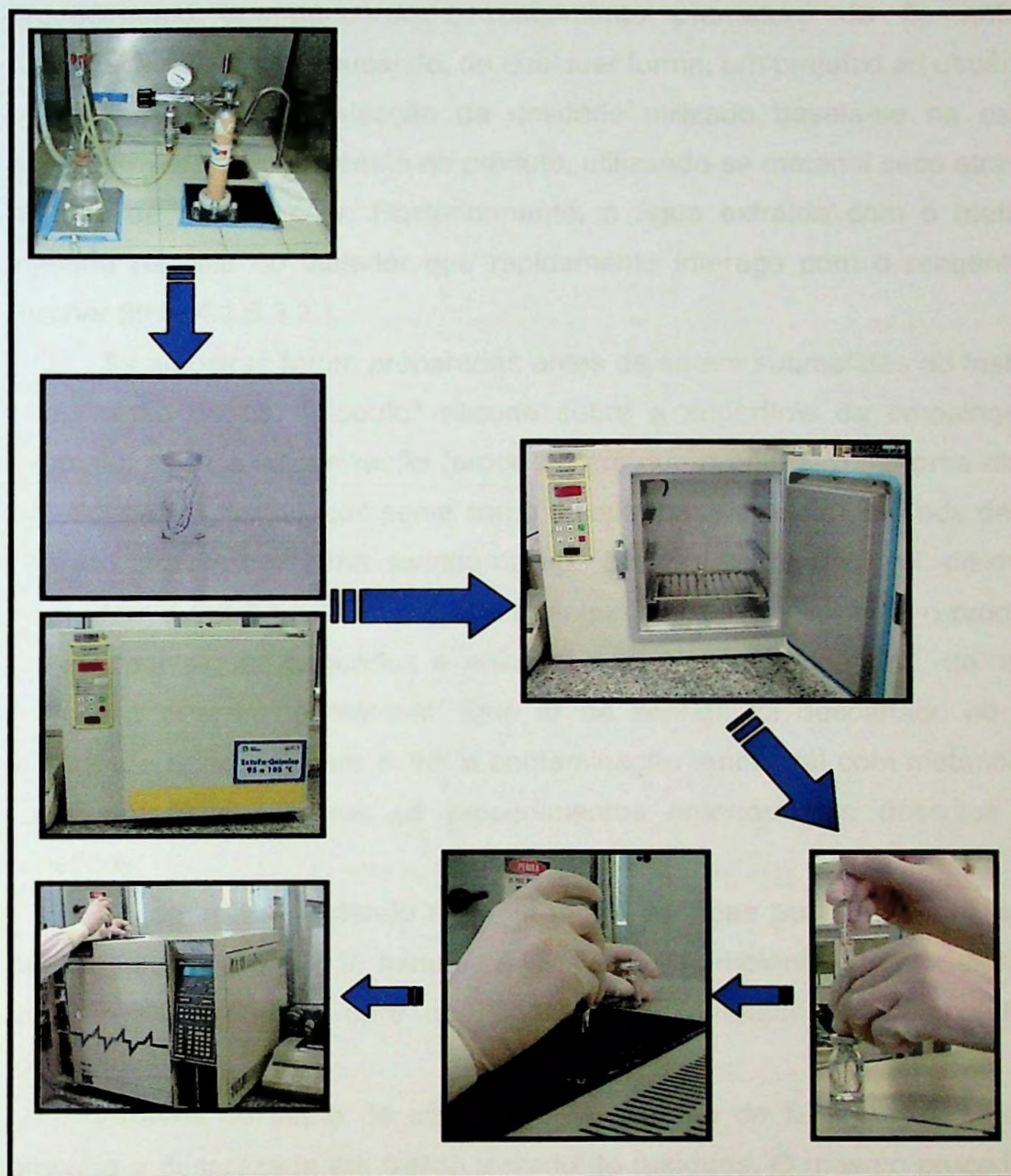


FIGURA 11 : Fluxograma do método de análise de óxido de etileno residual

4.2.2.2. Análise de umidade residual

O excesso de água presente na sutura cirúrgica sintética absorvível após o processo de esterilização pode levar a uma ruptura do fio durante o

procedimento operatório ou o rompimento prematuro do fio antes da cicatrização do tecido causando, de qualquer forma, um prejuízo ao usuário.

O método de detecção da umidade utilizado baseia-se na extração quantitativa da água presente no produto, utilizando-se metanol seco através do método de *Karl Fischer*. Posteriormente, a água extraída com o metanol é injetada na cela do titulador que rapidamente interage com o reagente *Karl Fischer* (item 4.1.6.3.2.).

As amostras foram preparadas antes de serem submetidas ao teste com a aplicação de um "glóbulo" silicone sobre a superfície da embalagem de alumínio. Após a vulcanização (processo em que o polímero se torna elástico) do silicone (48 horas), que serve como o septo para impedir a entrada de ar, foi inserido através dele uma seringa do tipo *gastight* contendo 4 mL de metanol seco (item 4.1.6.3.1.). Sem retirar a seringa do septo de silicone, o produto foi agitado por alguns segundos e retirado, aproximadamente, 3 mL de ar, sem permitir o retorno do metanol. Este ar da seringa foi descartado no frasco lacrado de resíduos, para evitar a contaminação ambiental com metanol. Para cada uma das amostras os procedimentos anteriormente descritos foram repetidos.

As amostras contendo metanol foram agitadas por 15 minutos e ainda descansaram por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Os produtos foram todos reinspecionados para que possíveis vazamentos de metanol fossem localizados.

Através do septo de silicone, uma alíquota de 500 μL foi retirada da amostra e desprezada em frasco lacrado de resíduos. O mesmo procedimento foi repetido na segunda alíquota. A terceira alíquota de 500 μL foi retirada da amostra e injetada na cela de titulação. Após o término da titulação, o valor em microgramas de água foi registrado. Para a mesma amostra foi repetido três vezes o procedimento de detecção de umidade, obtendo um desvio padrão relativo (RSD) menor ou igual a 20%.

O teor de água residual por produto foi obtido utilizando-se a seguinte equação:

Teor de água ($\mu\text{g} / \text{envelope}$) = $(2 \times (A - B) \times V)$, onde:

A = concentração da média de umidade por amostra em μg

B = concentração de umidade no metanol em μg

V = volume (mL) de metanol seco injetado no interior da amostra

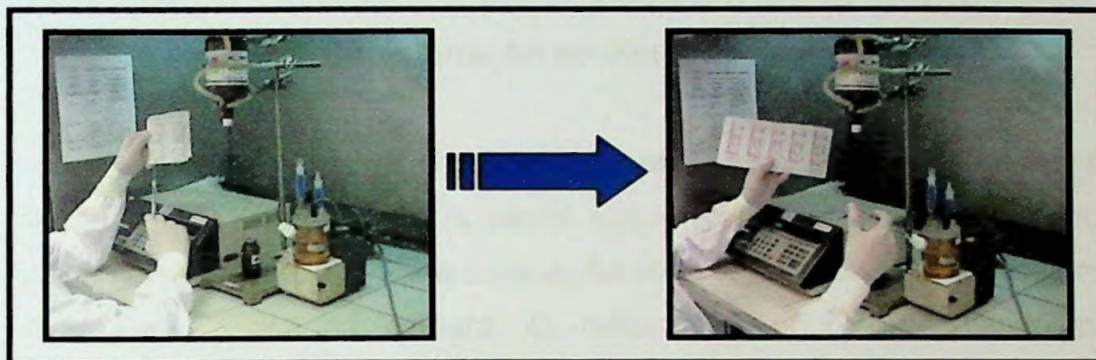


FIGURA 12 : Fluxograma do método de umidade residual

4.2.3. Qualificação dos parâmetros de processo

4.2.3.1. Concentração do óxido de etileno

A concentração do óxido de etileno durante a etapa de exposição foi obtida de forma indireta, ou seja, a partir da substituição dos valores de registro de pressão (diferencial de pressão) do gás esterilizante retirado das cartas gráficas dos processos de esterilização conforme figura 7 na equação de Claperon. A referida equação em sua forma integrada apresenta-se como:

$P \times V = n \times R \times T$, onde:

P = pressão em atmosferas

V = volume em litros

n = número de mol

R = constante universal dos gases = 0,082 atm.l / mol.K

T = temperatura em graus Kelvin

É importante registrar que as cartas gráficas utilizadas na obtenção dos valores foram as provenientes dos três meios ciclos realizados no método da sobremorte (qualificação microbiológica), portanto a concentração do óxido de etileno será a mínima especificada, uma vez que os ciclos foram processados com sua letalidade reduzida.

4.2.3.2. Concentração de umidade relativa

Com o uso da tabela de vapor saturado, na qual obtém –se a pressão de saturação do vapor de água a várias temperaturas, o valor do diferencial de pressão da injeção de vapor e a equação abaixo, foi obtido o valor de umidade relativa no interior da câmara. O método empírico preconizado para a determinação da umidade, utiliza a seguinte equação:

$$P_{\mu} = \left(\frac{\%UR \times P_g}{100\%} \right), \text{ onde:}$$

% UR = umidade relativa desejada

P_{μ} = pressão de vapor da água em mm Hg

P_g = pressão de saturação de vapor na temperatura da câmara no final da injeção de vapor em mm Hg

É importante registrar que as cartas gráficas utilizadas na obtenção dos valores foram as provenientes dos três meios ciclos realizados no método da sobremorte (qualificação microbiológica), portanto a concentração da umidade relativa será a mínima especificada, pois os ciclos foram processados com sua letalidade reduzida.

4.2.3.3. Temperatura

Na avaliação do parâmetro temperatura foi utilizado dez sensores do tipo termopar distribuídos em dez posições distintas da carga e colocados no interior do produto, podendo considerar este estudo com uma penetração de calor (figura 13) . Como nas variáveis anteriores, também foram utilizadas as cartas gráficas dos três meios ciclos método da sobremorte. Vale a pena registrar que a leitura dos valores de temperatura é direta.

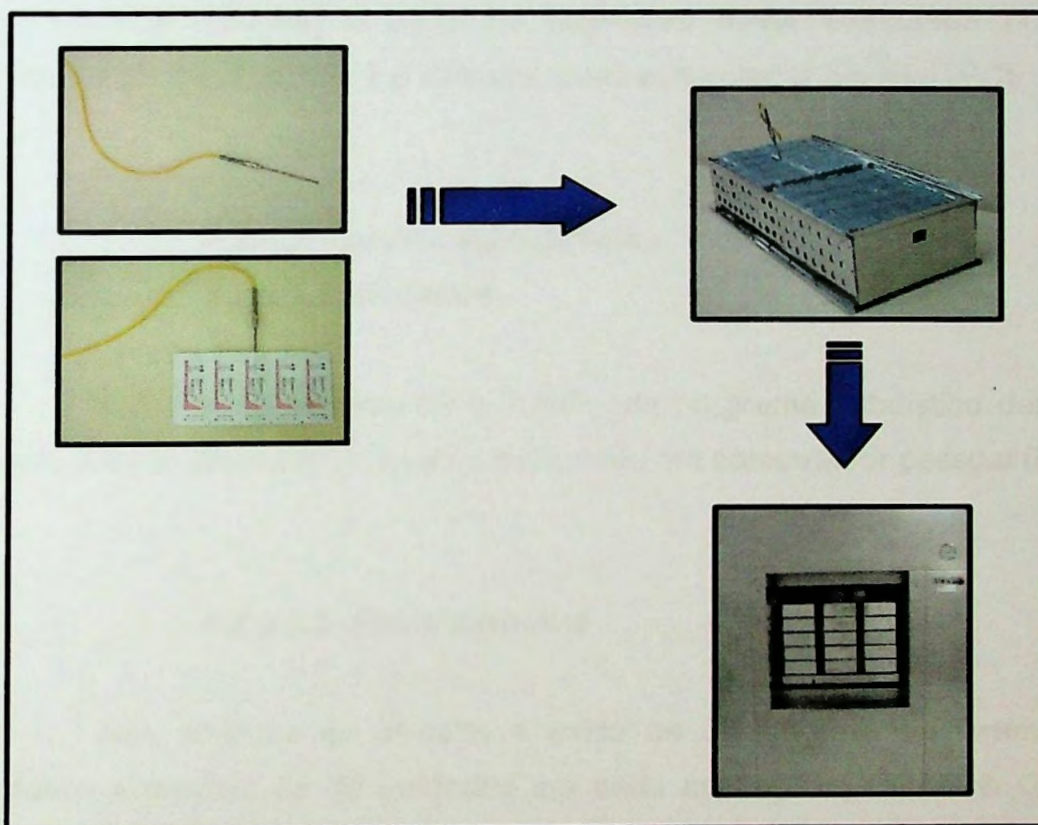


FIGURA 13 : Termopar e seu posicionamento na carga

4.2.3.4. Tempo

A leitura desta variável também é direta e foi obtida através da carta gráfica dos três meio ciclos, portanto o valor mínimo de tempo especificado nos

referidos processos foi de 240 minutos e este será considerado o valor de critério de sucesso.

4.2.4. Análise estatística

4.2.4.1. Qualificação microbiológica

A construção da curva de sobreviventes, o valor de D e o coeficiente de determinação (R^2 - mede o grau de relação existente entre duas variáveis) foram determinados a partir de regressão linear executada no software Microsoft® Excel versão 7.0 executado em computador pessoal (PC).

4.2.4.2. Qualificação química

4.2.4.2.1. Software

O software adotado foi o JUMP, um programa estatístico desenvolvido pelo SAS Institute Inc., o qual foi executado em computador pessoal (PC).

4.2.4.2.2. Plano amostral

Nas análises de unidade e óxido de etileno residual foram seguidos planos amostrais de 30 unidades em cada avaliação (JURAN & GODFREY, 1998).

4.2.4.2.3. Estatística descritiva

Foi feita uma análise descritiva dos dados de umidade e óxido de etileno residual, onde foram calculados as estatísticas, média e desvio padrão.

4.2.4.2.4. Estatística indutiva

Realizou-se teste de normalidade baseado no teste de Shapiro Wilks com a finalidade de verificar se o comportamento dos dados é normal, para tanto foi verificado o *p-value*. Se esta significância estatística (*p-value*), for superior ou igual a 0,05, pode-se inferir que o conjunto de dados analisados segue uma distribuição normal.

Verificou-se também o intervalo de predição, isto é, a estimativa da faixa de valores futuros obtidos pela população com um nível de confiança pré-determinado (95%). O referido intervalo foi calculado da seguinte forma:

$$\bar{X} \pm t \times S \times \sqrt{1 + \frac{1}{n}}, \text{ onde:}$$

\bar{X} = média

S = desvio

n = número de amostras

t = t de *Student* = 2,042, onde n - 1 = 29 e $\alpha/2 = 0,025$ (nível de significância)

4.2.4.3. Qualificação dos parâmetros de processo

4.2.4.3.1. Software

O software adotado foi o JUMP, um programa estatístico desenvolvido pelo SAS Institute Inc., o qual foi executado em computador pessoal (PC).

4.2.4.3.2. Estatística indutiva

A análise de variância (ANOVA) foi adotada para identificar a existência de diferença significativa entre as médias dos três ciclos para os parâmetros de

concentração do óxido de etileno e da temperatura, adotando-se nível de confiança de 95%. Quando o *p-value* for igual ou maior que 0,05 não se pode afirmar que existe diferença significativa entre as médias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Qualificação microbiológica

Na tabela 1 estão organizados os resultados dos testes de esterilidade das amostras da sutura sintética absorvível e do indicador biológico quando submetidos a onze tempos de exposição distintos. E a partir destes resultados foi montada a tabela 2 que trás os valores para a construção das curvas de sobrevivência.

Conforme as figuras 14 e 15 e tabela 3 pode-se constatar que os valores de D da sutura e do indicador biológico são iguais, atingindo 13,40 e 13,50 minutos, respectivamente, não havendo qualquer diferença significativa entre eles. Portanto, o uso do *Bacillus subtilis var. niger* na avaliação rotineira da eficiência do processo de esterilização está adequado e confiável.

Estes, porém, apresentaram zonas com crescimentos parciais bastante distintas. A carga microbiana da sutura cirúrgica sintética absorvível foi de apenas 40,10 UFC/produto, sem qualquer detecção de mesófilos, termófilos e patógeno. Como o valor de D obtido para o produto foi de 13,40 minutos e o tempo mínimo de exposição do processo de esterilização avaliado é de 480 minutos, conclui-se que a sutura cirúrgica tem 35 reduções logarítmicas, atingindo um SAL de 10^{-34} , ou seja, muito mais que o valor recomendado de 10^{-6} para este tipo de artigo médico-hospitalar. O SAL de 10^{-6} do produto é atingido com 93,80 minutos de exposição.

Conforme estudo semelhante desenvolvido por MOSLEY *et al.*, (2002a), sob as condições ambientais de 54 °C, 750 mg/L de EO e 60% de UR e 4 horas de exposição, uma sutura cirúrgica com carga microbiana inicial não mencionada, atingiu um SAL de 10^{-54} e valor de D de 6,30 minutos.

Segundo OXBORROW *et al.*, (1990), o *Bacillus subtilis var. niger.*, obteve um valor médio de D de 2,86 minutos, a 54 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ e 600 ± 30

mg/L, porém tal trabalho foi realizado em uma câmara específica para a determinação da resistência microbiana.

Os ciclos de sobremorte também obtiveram sucesso conforme resumido na tabela 4 e figura 16. Porém, conforme a tabela 2, observou-se que aos 96 minutos de exposição já não houve qualquer crescimento microbiano. Os dados obtidos estão em concordância com a de outros autores, dentre eles ALFA *et al.*, (1996) que a partir de um processo 105 minutos de exposição, a 750 mg/L de EO, 55 °C e 60% de UR, não houve crescimento microbiano do *Bacillus subtilis var. niger*.

Os fatos anteriormente descritos atestam que o atual processo de esterilização está super dimensionado e que o tempo de exposição do mesmo poderia ser reduzido em pelo menos 288 minutos, ou seja, em 60%.

TABELA 1 : Testes de esterilidade da sutura sintética absorvível e do indicador biológico *Bacillus subtilis var. niger*.

Nº do ciclo	Tempo de exposição (min)	Nº de IB's (n)	Nº de amostras de produto (n)	Carga microbiana (UFC/produto)		Resultados do teste de esterilidade (fração de positivos/nº de amostra total)	
				IB	Sutura	IB	Sutura
-	0	20	20	3,62x10 ⁸	4,01x10 ¹	-	-
1	12	20	20	-	-	20/20	18/20
2	24	20	20	-	-	20/20	14/20
3	36	20	20	-	-	20/20	1/20
4	48	20	20	-	-	20/20	1/20
5	60	20	20	-	-	17/20	0/20
6	72	20	20	-	-	6/20	0/20
7	84	20	20	-	-	3/20	0/20
8	96	20	20	-	-	0/20	0/20
9	160	20	20	-	-	0/20	0/20
10	200	20	20	-	-	0/20	0/20
11	240	20	20	-	-	0/20	0/20

n - Número total de amostras de bioindicador ou produto utilizado

IB - Indicador biológico

FIGURA 16: Sutura de absorvível e do indicador biológico *Bacillus subtilis var. niger*.

TABELA 2 : Dados para a construção da curva de sobrevivência da sutura sintética absorvível e do indicador biológico *Bacillus subtilis* var. *niger*.

Nº de IB's (n)	Nº de amostras de produto (n)	Nº de amostras com resultado negativo(r)		População de sobreviventes após um determinado tempo de exposição (Nu)		Log (Nu)	
		IB	Sutura	IB	Sutura	IB	Sutura
20	20	-	-	-	-	-	-
20	20	1	2	3,00	2,30	0,48	0,36
20	20	1	6	3,00	1,20	0,48	0,08
20	20	1	19	3,00	0,05	0,48	-1,29
20	20	1	19	3,00	0,05	0,48	-1,29
20	20	3	20	1,90	0,00	0,28	-
20	20	14	20	0,36	0,00	-0,45	-
20	20	17	20	0,16	0,00	-0,79	-
20	20	20	20	-	-	-	-
20	20	20	20	-	-	-	-
20	20	20	20	-	-	-	-
20	20	20	20	-	-	-	-

n - Número total de amostras de bioindicador ou produto utilizado

r - número de amostras com crescimento negativo

IB - Indicador biológico

Nu = $2,3 \log (n/r)$ - Concentração microbiana final após um determinado tempo de exposição

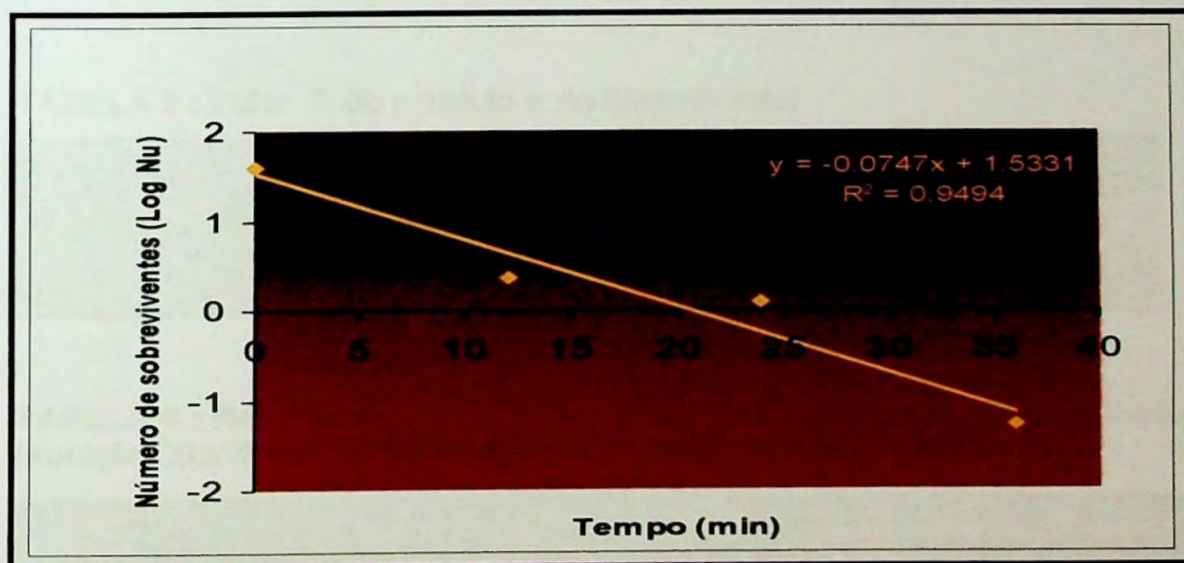


FIGURA 14 : Curva de sobrevivência microbiana da sutura cirúrgica sintética absorvível

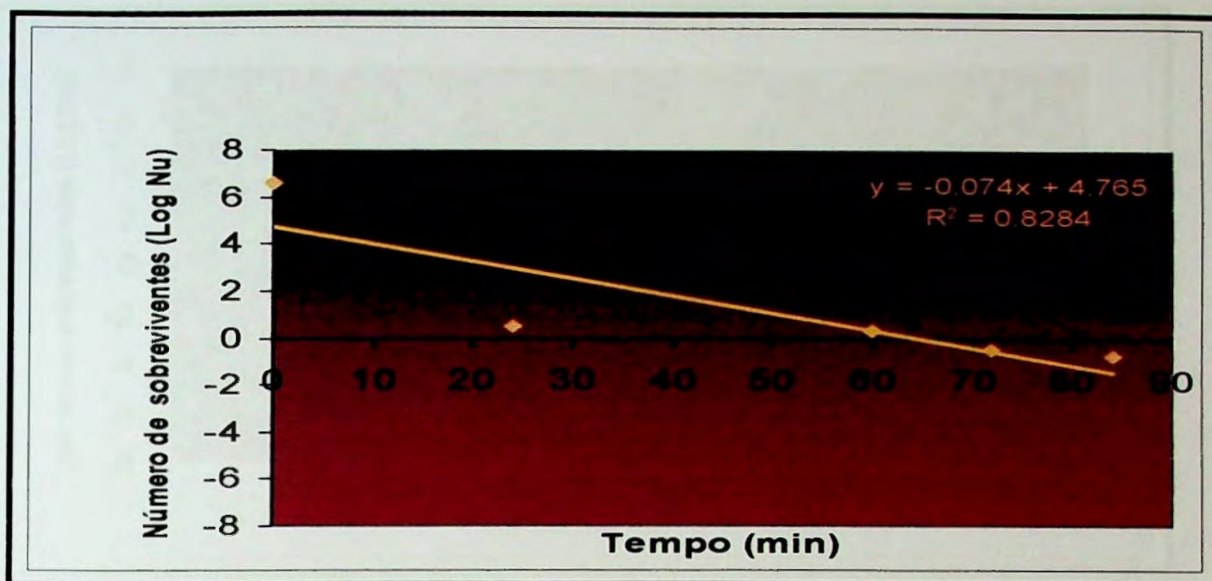


FIGURA 15 : Curva de sobrevivência do indicador biológico *Bacillus subtilis* var. *niger*.

TABELA 3 : Valor D do produto e do bioindicador

Amostra	Valor de D (minutos)
Sutura cirúrgica sintética absorvível	13,40
Indicador biológico	13,50

TABELA 4 : Resultados dos ciclos e sobremorte utilizando-se o indicador biológico *Bacillus subtilis* var. *niger*.

Nº do ciclo	Tempo de exposição (min)	Nº de IB's (n)	Carga microbiana (esporos/strip)	Resultados do teste de esterilidade (fração de positivos/nº de amostra total)
-	0	20	$3,62 \times 10^8$	-
1	240	20	-	0/20
2	240	20	-	0/20
3	240	20	-	0/20
4	480	20	-	0/20

n - Número total de amostras de bioindicador

IB - Indicador biológico

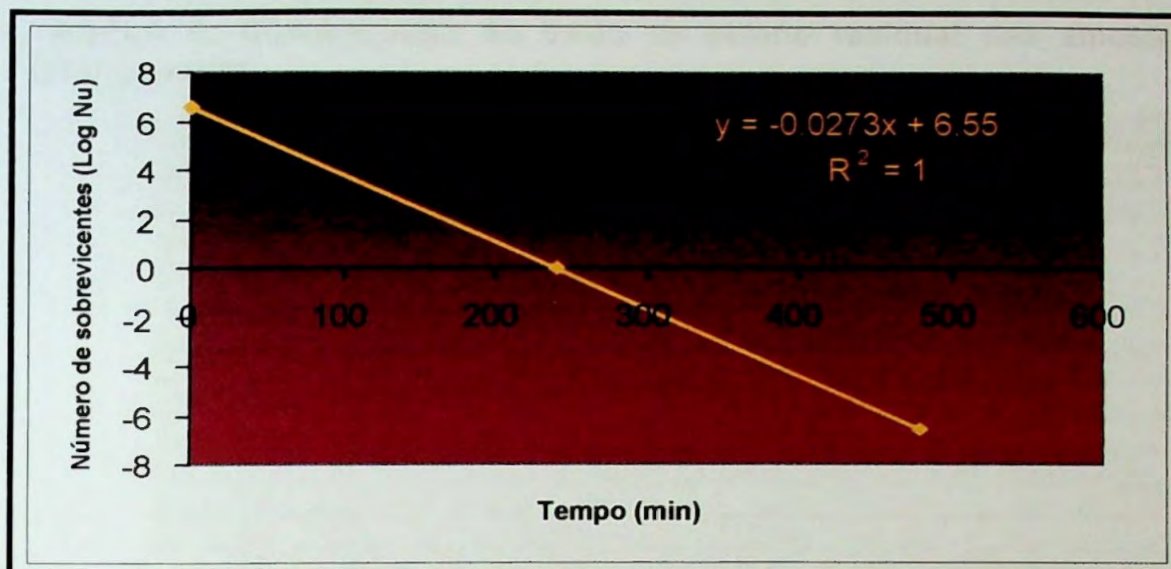


FIGURA 16 : Curva de sobrevivência do indicador biológico *Bacillus subtilis* var. *niger* pelo método de sobremorte ou meio ciclo

5.2. Qualificação química

5.2.1. Óxido de etileno residual

Os resultados do óxido de etileno residual das 30 amostras após a quarentena se encontram na tabela 5. A variação dos valores apresentados deve-se a diferença de posição na carga de onde estas amostras foram retiradas. Conforme anexo 1, o *p-value* de 0,52 obtido a partir dos resultados do óxido de etileno residual dos produtos após quarentena segue uma distribuição normal, uma média de 147,47 e desvio de 34,43. Com um nível de confiança de 95%, infere-se que a população futura apresentará valores de óxido de etileno residual entre 78,61 – 216,33 ppm, portanto, abaixo do limite máximo permitido de 250,00 ppm.

TABELA 5: Concentração do óxido de etileno residual das amostras (ppm/produto)

n° da amostra	Concentração de óxido de etileno residual (ppm/produto)
1	106,41
2	102,92
3	164,17
4	167,22
5	144,75
6	160,48
7	136,34
8	105,63
9	155,90
10	152,89
11	131,50
12	115,50
13	148,60
14	205,13
15	91,36
16	94,17
17	126,51
18	129,22
19	197,79
20	170,96
21	189,24
22	149,58
23	127,29
24	128,98
25	200,65
26	133,33
27	129,70
28	147,54
29	183,57
30	226,78
Média	147,47
Desvio padrão	34,43

5.2.2. Umidade residual

Os resultados da umidade residual das 30 amostras se encontram na tabela 6. A variação dos valores apresentados deve-se a diferença de posição na carga de onde estas amostras foram retiradas. Conforme anexo 2, o *p-value* de 0,08 obtido a partir dos resultados da umidade dos produtos segue uma

distribuição normal, uma média de 390,56 e desvio de 85,21. Com um nível de confiança de 95%, assegura-se que os valores de umidade futuros dos produtos se encontrarão na faixa de 220,14 – 560,98 ppm, portanto, aquém do limite máximo permitido de 750,00 μg de água por produto, portanto em conformidade com seus critérios de qualidade.

TABELA 6: Concentração da umidade residual das amostras ($\mu\text{g}/\text{produto}$)

nº da amostra	Concentração de umidade ($\mu\text{g}/\text{produto}$)
1	358,00
2	432,00
3	404,00
4	363,00
5	304,00
6	427,00
7	319,00
8	326,00
9	321,00
10	518,00
11	530,00
12	358,00
13	414,00
14	476,00
15	402,00
16	477,00
17	454,00
18	302,00
19	304,00
20	279,00
21	264,00
22	276,00
23	289,00
24	346,00
25	404,00
26	377,00
27	406,00
28	544,00
29	520,00
30	523,00
Média	390,56
Desvio padrão	85,21

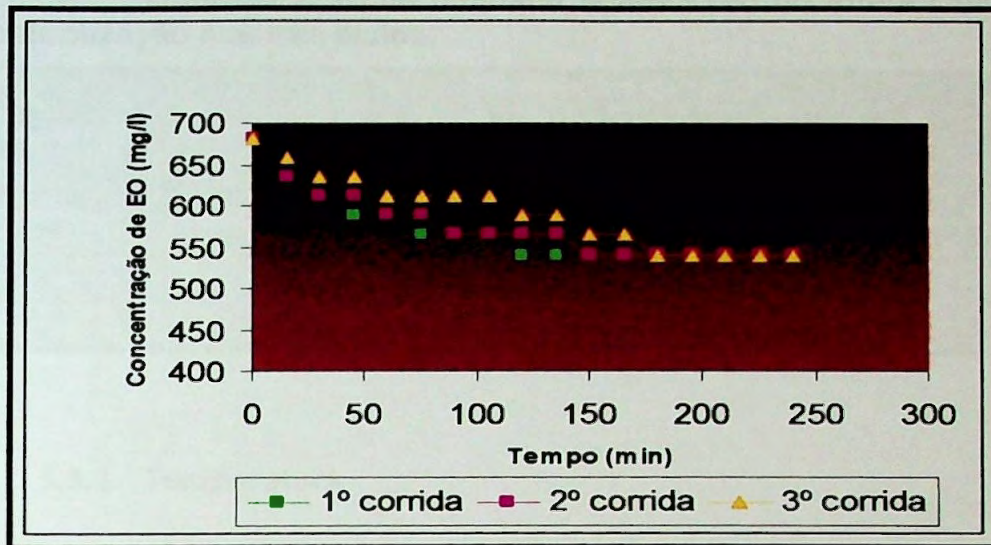


Figura 17 : Curva da concentração do EO (mg/L) no interior da câmara de esterilização por tempo (min).

5.3.2. Concentração de umidade relativa

Como as cartas gráficas dos processos de esterilização analisados (três corridas) apresentam apenas um ponto referente à pressão em mm Hg atingido pelo vapor d'água, utilizou-se apenas um valor por corrida para o cálculo da concentração da umidade relativa no interior da câmara. O valor da umidade relativa atingido em todas elas foi de 81,43%. Os dados obtidos descrevem um processo com reprodutibilidade atestada.

TABELA 8 : Concentração da umidade relativa (%) no interior da câmara de esterilização nos três ciclos.

Nº da corrida	Pressão (mm Hg)	Temperatura da câmara no final da injeção de vapor (°C)	UR (%)
1º	20	27	81,43
2º	20	27	81,43
3º	20	27	81,43

5.3.3. Temperatura

De acordo com anexo 4, constatou-se com um nível de confiança de 95%, que não existe diferença significativa entre as médias das temperaturas dos 10 termopares avaliados entre as três corridas, uma vez que o *p-value* obtido foi de 0,05. A temperatura média das médias (três corridas) foi de 27,86 °C. As tabelas 9, 10 e 11 comprovam que as temperaturas nos produtos (penetração de calor) durante a etapa de exposição são bastante homogêneas, apresentando uma variação máxima de 2 °C entre os termopares a um dado momento.

O mesmo estudo de CAPUTO & ROHN,(1982), mencionado no item 5.3.1., avaliou os efeitos de alguns parâmetros de processo na esterilização por EO e concluiu que a temperatura apresenta ser o mais linear em termos de efeitos.

TABELA 9 : Temperatura (°C) durante a etapa de exposição nos 10 termopares - Penetração de calor - 1º corrida.

Termopar	TEMPERATURA (°C)																		
	Tempo															Soma (°C)	Média (°C)	Desvio	> Variação (°C)
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min	135 min	150 min	165 min	180 min	195 min					
10	28,00	28,00	28,50	28,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	393,00	28,07	0,18	0,50
11	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	29,00	29,00	29,00	29,00	29,00	395,50	28,25	0,61	1,50	
12	27,00	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	390,50	27,89	0,29	1,00	
13	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00	
18	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00	
22	28,00	28,00	28,50	28,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	393,00	28,07	0,18	0,50	
23	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00	
24	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00	
25	27,00	27,50	27,50	27,50	27,50	27,50	27,50	27,50	28,00	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	386,50	27,61	0,29	1,00	
Fixo 26	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00	
> Variação (°C)	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	1,50	1,50	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-	

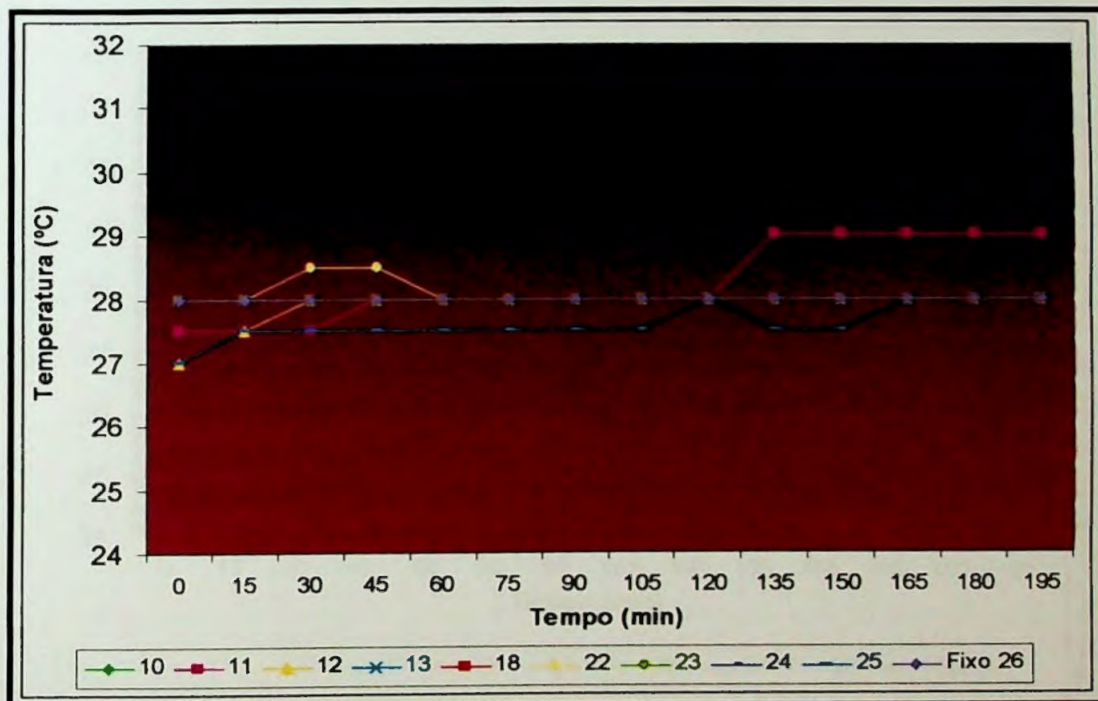


FIGURA 18 : Temperatura (°C) x tempo (min) durante a etapa de exposição dos 10 termopares - 1ª corrida

TABELA 10 : Temperatura (°C) durante a etapa de exposição nos 10 termopares - Penetração de calor - 2º corrida .

Termopar	TEMPERATURA (°C)																			
	Tempo																Soma (°C)	Média (°C)	Desvio	>Variação (°C)
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min	135 min	150 min	165 min	180 min	195 min						
10	27,00	27,00	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	388,50	27,75	0,38	1,00	
11	27,00	27,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	390,00	27,86	0,36	1,00	
12	27,00	27,00	27,00	27,50	27,00	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	386,00	27,57	0,43	1,00	
13	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	385,50	27,54	0,46	1,00	
18	27,00	27,00	27,00	27,50	27,50	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	386,50	27,61	0,40	1,00	
22	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00	
23	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	391,00	27,93	0,18	0,50	
24	27,00	27,00	27,00	27,50	27,50	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	29,00	29,00	388,50	27,75	0,64	2,00	
25	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	378,00	27,00	0,00	0,00	
Fixo 26	27,00	27,50	28,00	27,00	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	29,00	29,00	29,00	391,00	27,93	0,58	2,00	
> Variação (°C)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	-	-	-	-	-	

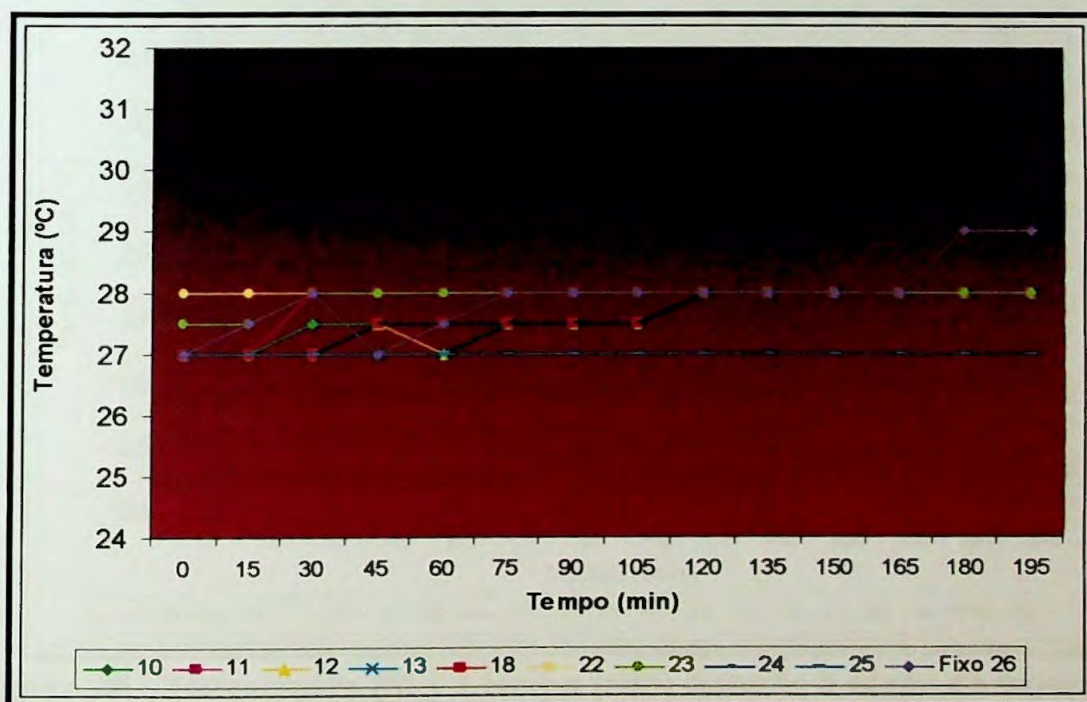


Figura 19 : Temperatura (°C) x tempo (min) durante a etapa de exposição dos 10 termopares - 2ª corrida

TABELA 11 : Temperatura (°C) durante a etapa de exposição nos 10 termopares - Penetração de calor - 3ª corrida.

Termopar	TEMPERATURA (°C)																			
	Tempo																Soma (°C)	Média (°C)	Desvio	>Variação (°C)
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min	135 min	150 min	165 min	180 min	195 min						
10	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
11	27,00	27,00	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	388,50	27,75	0,28	1,00
12	27,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	391,00	27,93	0,27	1,00
13	27,00	27,00	27,00	27,50	27,50	27,50	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	387,50	27,68	0,42	1,00
18	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
22	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
23	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
24	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
25	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
Fixo 26	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	392,00	28,00	0,00	0,00
> Variação (°C)	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-

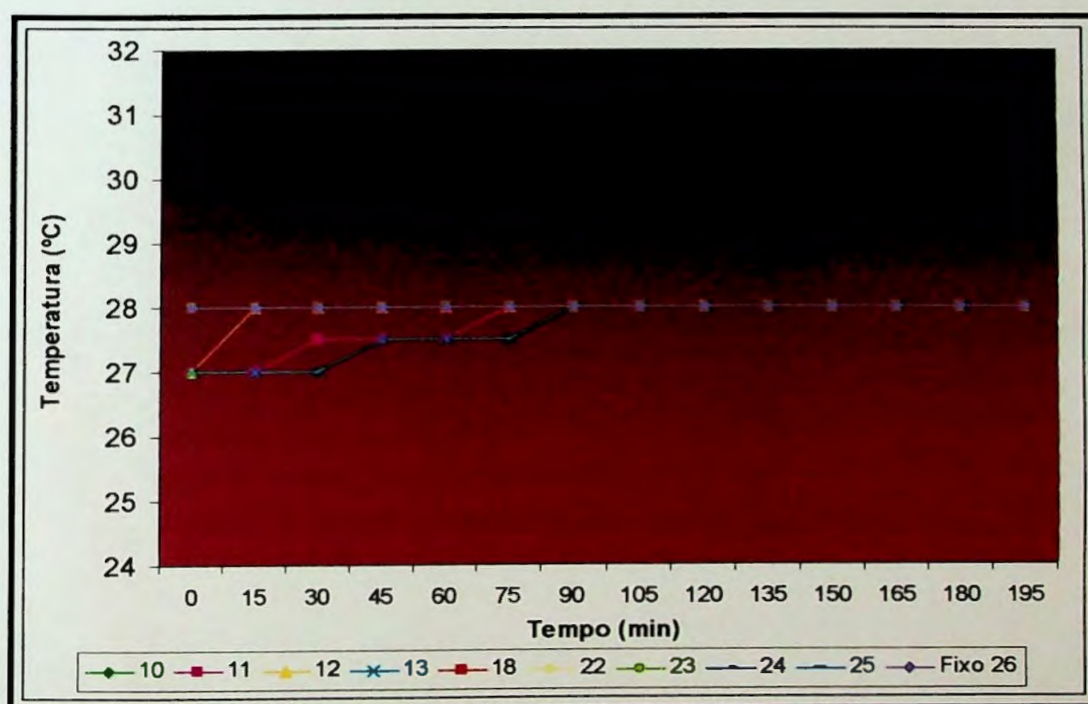


Figura 20 : Temperatura (°C) x tempo (min) durante a etapa de exposição dos 10 termopares - 3ª corrida

Devido à obtenção de valores de temperatura iguais, alguns termopares apresentaram gráficos sobrepostos, conforme observado nas figuras 18, 19 e 20.

5.3.4. Tempo

Os valores dos tempos de exposição dos produtos ao agente esterilizante também refletem uma reprodutibilidade nas três corridas distintas, ou seja, todas se apresentaram conforme leituras das cartas gráficas 240,00 minutos de tempo de contato conforme descrito na tabela 12.

TABELA 12 : Tempo (min) de exposição obtido nos três ciclos.

Nº da corrida	Tempo (min)
1º	240,00
2º	240,00
3º	240,00

6. CONCLUSÕES

- ➔ O uso do indicador biológico *Bacillus subtilis var. niger* no monitoramento da eficiência do processo de esterilização por óxido de etileno de suturas cirúrgicas está adequado, uma vez que sua resistência (valor de D) ao referido processo é igual a resistência da carga microbiana presente no produto, ou seja, na sutura cirúrgica sintética absorvível. O valor de D do bioindicador a 540,69 mg de EO, 81,43% de umidade relativa e a 27,86 °C é de 13,50 minutos enquanto que a do produto sob as mesmas condições é de 13,40 minutos;
 - ➔ Concluiu-se que através do método da sobremorte (meio ciclo) o processo de esterilização por EO atinge um SAL de 10^{-6} na metade do tempo total da etapa de exposição, ou seja, aos 240,00 minutos;
 - ➔ O SAL atingido pela sutura cirúrgica sintética absorvível foi de 10^{-34} ;
 - ➔ Tanto o teor de umidade quanto o de óxido de etileno residual ficaram abaixo dos limites máximos especificados de 750,00 µg/ produto e 250,00 ppm/ produto, respectivamente, obtendo uma média de $390,56 \pm 85,21$ µg de umidade por produto e $147,47 \pm 34,43$ ppm por produto;
 - ➔ O processo de esterilização por óxido de etileno em questão é reprodutível, uma vez que em três ciclos distintos as variáveis avaliadas (temperatura, tempo de exposição, concentração de óxido de etileno e umidade relativa), não apresentaram diferenças significativas.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N.; PUCHALSKI, B.A.A. Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorefare, v.17, p.92-100, 1996.

ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N. Bacterial killing ability of 10% ethylene plus 90% hydrochlorofluorcarbon sterilizing gas. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorefare, v.18, n.9, p.641-664, 1997.

ALFA, M.J.; DEGAGNE, P.; OLSON, N.; HIZON, R. Comparison of liquid chemical sterilization with peracetic acid and ethylene oxide sterilization for long narrow lumens. **Am. J. Infect. Control**, Saint Louis, v.26, n.5, p.469-477, 1998.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION; ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Medical devices validation and routine control of ethylene oxide sterilization**. Arlington: AAMI, 1994. (American National Standard. ANSI/AAMI/ISO 11135-1994).

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. **Sterilization of health care products: biological indicators: part 1: general requirements**. Geneve: International Organization for Standardization, 1994. (International standard ISO 11138-1:1994).

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. **Sterilization of health care products: biological**

indicators: part 2: biological indicators for ethylene oxide sterilization. Geneve: International Organization for Standardization, 1994. (International standard ISO 11138-2:1994).

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. **Biological evaluation of medical devices**: part 7: ethylene oxide sterilization residual. Geneve: International Organization for Standardization, 1995. (International standard ISO 10993-7:1995).

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. **Sterilization of medical devices**: microbiological methods: part 1: estimation of bioburden. Geneve: International Organization for Standardization, 1995. (International standard 11737-1:1995).

BRASIL. Lei n.5.991, de 17 de dezembro de 1973. **Diário Oficial União**, Brasília, 21 dez. 1973. p.12647.

BRASIL. Portaria Interministerial n.482, de 16 de abril de 1999. **Diário Oficial União**, Brasília, 19 abr. 1999. p.15.

BRITISH STANDARD. **Sterilization of medical devices – Validation and routine control of ethylene oxide sterilization**: EN 550, 1994.

BRUCH, C.W. The philosophy of sterilization validation. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology**: a practical guide for manufactures and users of health care products. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. p.17-35.

BURGESS, D.J.; REICH, R.R. Industrial ethylene oxide sterilization. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology**: a

practical guide for manufactures and users of health care products. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. p.152-195.

CAPUTO, R.A.; ROHN, K.J. The effects of EO sterilization variables on BI performance. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, jul., p.37-41, 1982.

CRISTENSEN, E.A.; KRISTENSEN, H. Biological indicators for the control of ethylene sterilization. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, Copenhagen, v.87, p.147-154,1979.

ELLIS, J.R. EO: does it have a future? **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, fev., p.50-52, 1990.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 1213p.

GASPAR, M.C.; PELÁEZ, B.; FERNADEZ, C.; FERERES, J. Microbiological efficacy of sterrad 100S and LTSF sterilization systems compared to ethylene oxide. **Zent. Steril.**, Wiesbaden, v.10, n.2, p.91-99, 2002.

GILLIS, J.R. Ethylene oxide sterilization and validation for practical pharmaceutical aseptic production. In: CARLETON, F.J., AGALLOCO, J.P., eds. **Validation of aseptic pharmaceutical processes**. New York: Marcel Dekker, 1986. p.357-376.

GRAHAM, G.S.; BORIS, C.A. Chemical and biological indicators. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology: a practical guide for manufactures and users of health care products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. p.36-69.

HALVORSON, H.O.; ZIEGLER, N.R. Application of statistics to problem in bacteriology. **J. Bacteriol.**, Washington, v.25, p.101-121, 1933.

HUCKER, G.; MACHMERTH, R.; KRAMER, A. Validation of sterilization processes with ethylene oxide. **Zent. Steril.**, Wiesbaden, v.9, n.5, p.335-345, 2001.

KERELUK, K.; GAMMON, R.A.; LOYD, R.S. Effects of thickness of polyethylene film on the sporicidal activity of ethylene oxide. **Appl. Microbiol.**, Baltimore, v.19, n.1, p.163-165, 1970.

JORKASKY, J.F. Ethylene oxide environmental, worker exposure and chlorofluorocarbon regulations. In: KILMER, F.B.F.; MORRISSEY, R.F., eds. **Sterilization of medical products**. Canada: Polyiscience Publication, 1990. Brussels: Johnson and Johnson, 1993. p.155-165. (Sterilization of medical products, v.6) (6th International Kilmer memorial conference. Papers and discussions).

JOSELYN, L.J. Gaseous chemical sterilization. In: BLOCK, S.S., ed. **Disinfection, sterilization and preservation**. 5.ed. Philadelphia, London: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.337-359.

JURAN, J.M.; GODFREY, A.B., eds. **Juran's quality handbook**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1998. 441p.

JUSTI, C.; AMATO, V.; ANTOLOGA, K.; HARRINGTON, S.; MCDONNELL, G. Demonstration of a sterility assurance level for a liquid chemical sterilization process. **Zent. Steril.**, Wiesbaden, v.9, n.3, p.170-177, 2001.

LINK, D.M.; MACDONNELL, E.J. **Current issues in medical devices quality systems**. Arlington: Association for the advancement of medical instrumentation, 1997.

- MACHMERTH, R. Sterilization kinetics. **Zent. Steril.**, Wiesbaden, v.4, n.6, p.234-241, 1998.
- MANNINIG, C.R. Controlling EO residues from the manufacture of medical products. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, jun., p.136-144, 1989.
- MOSLEY, G.A.; GILLIS, J.R.; WHITBOURNE, J.E. Calculating equivalent time for use in determining the lethality of EO sterilization processes. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, fev., p.54-63, 2002a.
- MOSLEY, G.A. Estimating the effects of et.o. bier – Vessel operating precision on D-value calculations. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, p.46-56, abr. 2002b.
- OXBORROW, G.S.; TWOHY, C.W.; DEMITRIUS, C.A. Determining the variability of bier vessels for EO steam. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, maio, p.78-83, 1990.
- PAGE, B.F.J. Special considerations for ethylene oxide: product residues. In: MORRISSEY, R.F.; PHILLIPS, G.B., eds. **Sterilization technology: a practical guide for manufactures and users of health care products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. p.402-420.
- PARISI, A.N. Advances in ethylene oxide sterilization. In: GAUGHARAN, E.R.L.; MORRISSEY, R.F. **Sterilization of medical products**. Montreal: Multiscience Publication, 1981. p.187-201.
- PENNA, T.C.V. Validação de processo de esterilização I: conceitos básicos. **Laes (Haes)**, São Paulo, abr., p.44-48, 1994.

- PENNA, T.C.V. Esterilização química por óxido de etileno: parâmetros de eficácia e aspectos atuais. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo**, São Paulo, v.33, p.1-5, 1997.
- PINTO, T.J.A. Esterilização térmica: conceitos básicos da cinética de morte microbiana. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.33, p.7-15, 1997.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 309p.
- RODRICKS, J.V.; BROWN, S.L. Ethylene oxide residuals: toxicity, risk assessment and standards. In: MORRISSEY, R.F. **Sterilization of medical products**. volume VI. Canada: Polyscience, 1990. p.166-183. In: KILMER, F.B.F.; MORRISSEY, R.F., eds. **Sterilization of medical products**. Canada: Polyscience Publication, 1990. Brussels: Johnson and Johnson, 1993. p.155-165. (Sterilization of medical products, v.6) (6th International Kilmer memorial conference. Papers and discussions).
- RODRIGUEZ, A.C.; YOUNG, B.; CAULK, K.; ZELEWSKI, J.; KWASNICA, S.; AGIRRE, S. et al. Calculating accumulated lethality and survivorship in EO sterilization processes. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, set., p.100-107, 2001.
- RUTALA, W.A. Disinfections and sterilization of patient-care items. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorefare, v.17, n.6, p.377-384, 1996.
- RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Clinical effectiveness of low-temperature sterilization technologies. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorefare, v.19, n.10, p.798-804, out. 1998a.

RUTALA, W.A.; GERGEN, M.F.; WEBER, D.J. Comparative evaluation of sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, two plasma sterilization systems and liquid peracetic acid. **Am. J. Infect. Control**, Saint Louis, v.26, n.4, p.393-398, 1998b.

SMITH, P.G. Continuous monitoring of EO concentration during sterilization. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, fev., p.80-88, 2001.

SORDELLINI, P.J. Parametric release comes to EO sterilization. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, p.66-69, 1996.

SORDELLINI, P.J. Speeding Et.O.: sterilized products to market with parametric release. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, p.67-80, fev. 1997.

SORDELLINI, P.J.; CAPUTO, V.A. Evaluating sterilizer performance as part of process equivalency determination. **Med. Device Diagn. Ind.**, Santa Monica, nov., p.90-95, 1996.

UNITED States Pharmacopoeia: USP 25. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2002.2923p.

WHITBOURNE, J.E.; REICH, R.R. Ethylene oxide biological indicators: need for stricter qualification testing control. **J. Parent. Drug Assoc.**, Philadelphia, v.33, n.3, p.132-143, 1979.

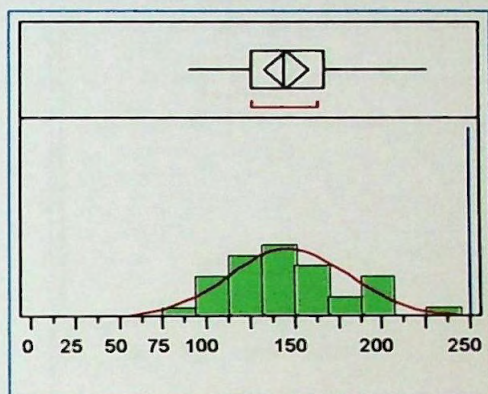
ZAYEVA, G.N.; KOPYLOVA, L.S.; LICHTMAN, T.V.; KOLESNIKOVA, N.I.; HERZOG, V. Ethylene oxide residuals: toxicity, risk assessment and standards. In: MORRISSEY, R.F. **Sterilization of medical products: volume VI**. Canada: Polyiscience, 1990. p.184-193. In: KILMER, F.B.F.; MORRISSEY, R.F., eds. **Sterilization of medical products**. Canada: Polyiscience Publication, 1990. Brussels: Johnson and

Johnson, 1993. p.155-165. (Sterilization of medical products, v.6) (6th International Kilmer memorial conference. Papers and discussions).

ANEXO 1

Distribuição normal dos dados de óxido de etileno residual

Oxido de etileno residual (ppm/produto) após quarentena

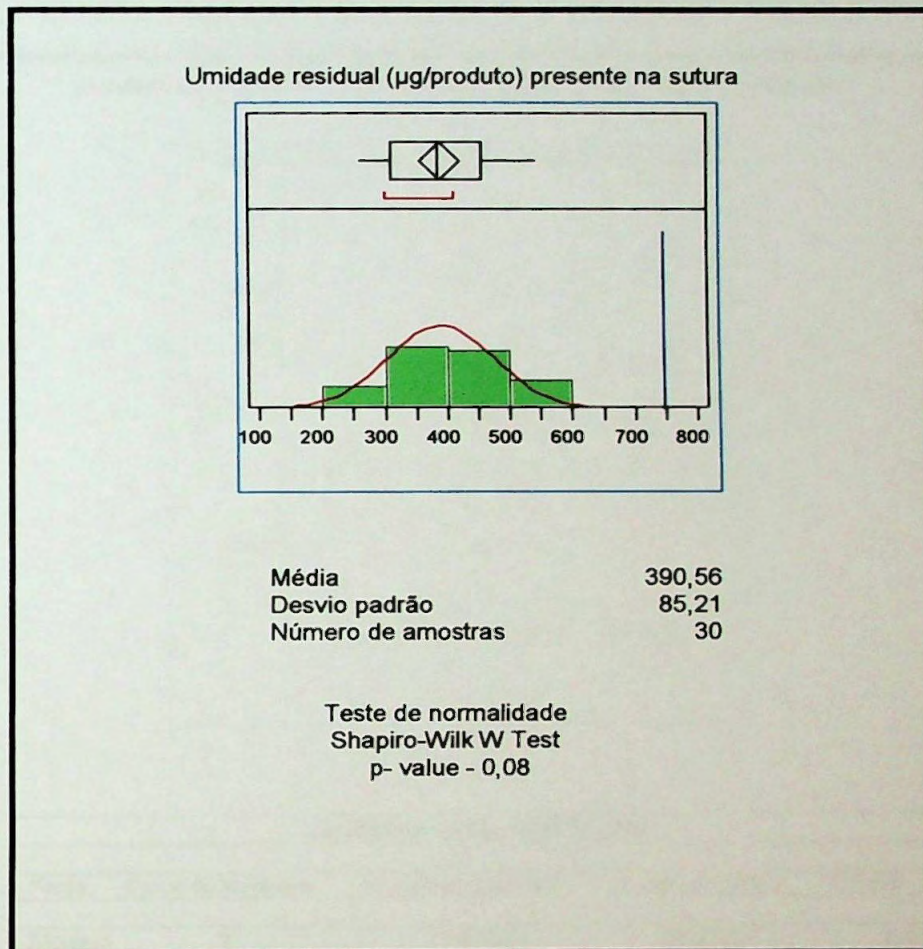


Média	147,47
Desvio padrão	34,43
Número de amostras	30

Teste de normalidade
Shapiro-Wilk W Test

p- value - 0,52

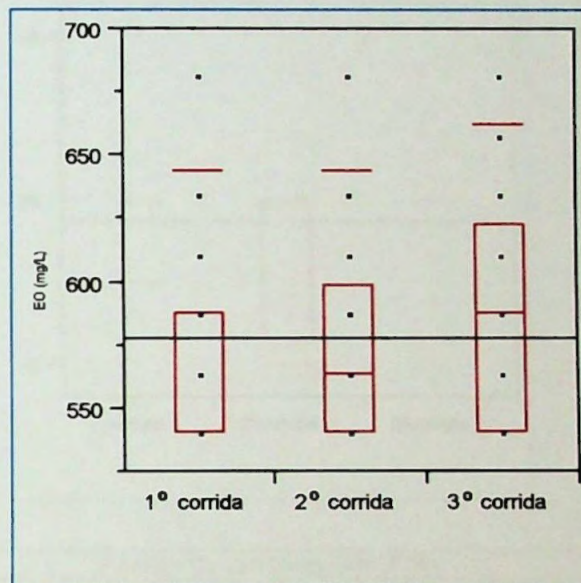
ANEXO 2:
Distribuição normal dos dados de umidade residual



ANEXO 3

Análise de variância da concentração de EO (mg/L) nas três corridas.

Análise de variância - Concentração de EO (mg/L) nas três corridas



Análise de variância (ANOVA)

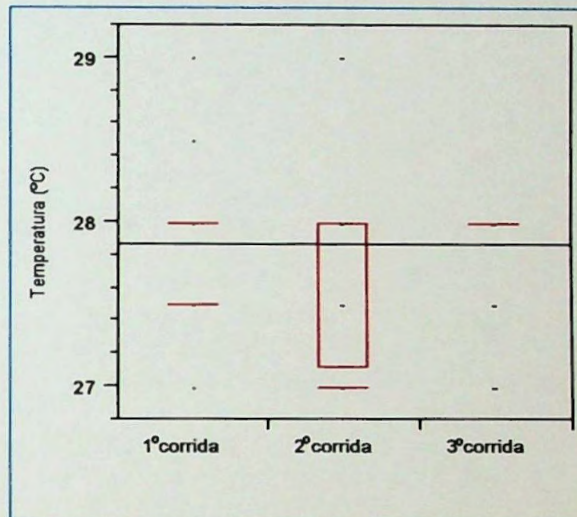
Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F Ratio
Modelo	2	5135,74	2567,87	1,43
Erro	48	85687,25	1785,15	p- value
C Total	50	90823,00	1816,46	0,25

Processo	Número de amostras	Média	Desvio padrão
1º corrida	17	568,31	10,25
2º corrida	17	573,89	10,25
3º corrida	17	591,75	10,25

ANEXO 4

Análise de variância da temperatura (°C) nas três corridas.

Análise de variância - Temperatura (°C) das três corridas



Análise de variância (ANOVA)

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F Ratio
Modelo	2	6,32	3,16	25,71
Erro	417	51,31	0,12	p- value
C Total	419	57,64	0,13	0,05

Processo	Número de amostras	Média	Desvio padrão
1º corrida	140	27,96	0,02
2º corrida	140	27,69	0,02
3º corrida	140	27,93	0,02

ANEXO 5:
Publicação “Ethylene Oxide Sterilization of Surgical Sutures Monitored by
Bacillus subtilis”

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO