

DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO
ÓXIDO DE ETILENO (EM MISTURA COM
NITROGÊNIO - 45%EO/55%N₂) DE
ESPOROS DE *Bacillus subtilis* var.
niger (*globigii*) EM FITAS
CARREGADORAS DE PAPEL

Parar
Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por
Alba Valéria dos Santos e Aprovada pela Comissão em 12.09.94.

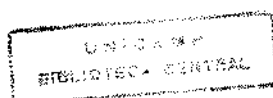
Pilar R de Massaguer

ALBA VALÉRIA DOS SANTOS
Engenheira de Alimentos

Prof. Dra. PILAR RODRIGUES DE MASSAGUER
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências de Alimentos

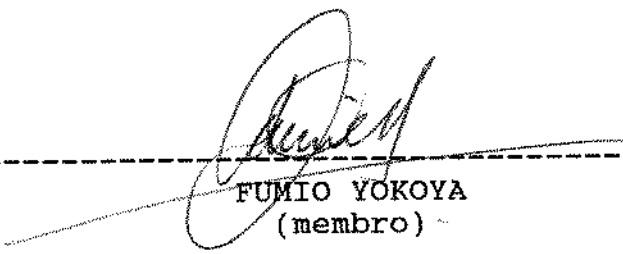
Campinas - São Paulo
1994



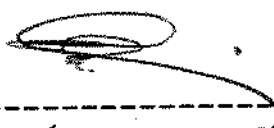
BANCA EXAMINADORA



ORIENTADOR: PILAR RODRIGUES DE MASSAGUER



FUMIO YOKOYA
(membro)



JOSÉ SANTO GOLBONI
(membro)



EDIR NEPOMUCENO SILVA
(suplente)

Campinas, 12 de julho de 1994

Ao Paulo,
pelo amor e compreensão

A memória de meus pais, Élide e Orival,
pelo eterno carinho e dedicação

A meus irmãos, Júlio, Cláudio e Júnior,
pelo estímulo e confiança

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, PILAR RODRIGUES de MASSAGUER, pelo conhecimento técnico, atenção e estímulo;

Ao apoio dado pela JOHNSON & JOHNSON PROD. PROF. LTDA, que permitiu a execução da parte experimental do trabalho em suas instalações, e em particular ao laboratório de Garantia de Qualidade e Desenvolvimento Biociências e à área de Esterilização por Óxido de Etileno, grandes responsáveis pelo sucesso do trabalho. Meus agradecimentos especiais aos seguintes profissionais e amigos:

- . CARLOS A. M. FERRAZ, pelo conhecimento técnico e incentivo;
- . RENATO C. CARNEVALLI, pela inestimável ajuda, capacidade técnica, disponibilidade e estímulo;
- . LUÍS A. BORGES, pelo conhecimento técnico, apoio e colaboração constante;
- . VALÉRIA ORTEGA DE CARVALHO, pelos ensinamentos, discussões elucidativas e companheirismo;
- . SÔNIA C. B. BIASI, pela colaboração;
- . NICE T. SHINYE, ANA MARIA RAGONESE, JANETE A. DIAS, CLEMENTINA ANDRADE, ELBA C. L. PEREIRA e M. ÁGUIDA CASSOLA, pela força de trabalho, disponibilidade e boa vontade;
- . WASSILA J. ITANI, pelo apoio nos testes químicos;
- . Toda equipe Eto - FRANCISCO NAKAGAWA, ROGÉLIO, ADMILSON, ALFREDO, CLAUDINEY, DONIZETE, FRANCISCO, GERALDO, IVAN, LUÍZ CLÁUDIO, MANOEL, ROBERTO DIMAS, ROBERTO PINTO, SILAS e VANDERLEI que sempre se dispôs a colaborar;

A todos que direta ou indiretamente participaram dos testes, discussões e auxílio técnico-administrativo, contribuindo para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
NOMENCLATURA	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Evolução Histórica	4
2.2. Esterilização por Óxido de Etileno	5
2.2.1. Propriedades do Óxido de Etileno	6
2.2.2. Atividade Antimicrobiana do Óxido de Etileno	8
2.2.2.1. Efeito da Concentração de Gás.....	10
2.2.2.2. Efeito da Umidade Relativa.....	12
2.2.2.3. Efeito da Temperatura.....	14
2.2.2.4. Efeito do Tempo de Exposição.....	15
2.2.2.5. Efeito do Material de Suporte dos Microrganismos.....	16
2.2.3. Uso de Óxido de Etileno	17
2.2.3.1. Esterilização por Óxido de Etileno de Produtos Médicos	17
2.2.3.2. Esterilização por Óxido de Etileno de Produtos Alimentícios	20
2.2.4. Indicadores Biológicos nos Processos de Esterilização por Óxido de Etileno	23
2.2.4.1. Microrganismo Indicador	24
2.2.4.2. Fatores que Afetam a Resistência do Indicador Biológico	26
2.2.4.2.1. Resistência Determinada Genotipicamente.....	27
2.2.4.2.2. Influência Ambiental durante Crescimento e Esporulação	27

2.2.4.2.3. Ambiente durante Estocagem	29
2.2.4.2.4. Influência do Ambiente durante Esterilização	30
2.2.4.2.5. Influência das Condições de Recuperação	31
2.2.4.3. Avaliação da Resistência do Indicador Biológico	34
2.2.4.4. Padrões e Requerimentos no Uso do Indicador Biológico	42
2.2.5. Equipamento de Esterilização por Óxido de Etileno	45
2.3. Validação de Indicador Biológico e do Processo de Esterilização por Óxido de Etileno.....	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1. Organismos	54
3.2. Preparo da Suspensão de Esporos	54
3.2.1. Preparo da Suspensão Estoque	54
3.2.2. Preparo da Suspensão Trabalho	55
3.3. Preparo do Indicador Biológico tipo Fita Carregadora	56
3.4. Avaliação da Concentração de Esporos	56
3.4.1. Suspensão Estoque	56
3.4.2. Suspensão Trabalho	57
3.4.3. Indicador Biológico tipo Fita Carregadora...	57
3.5. Amostras	58
3.5.1. Avaliação da Performance dos Indicadores Biológicos X Condições de Armazenamento	58
3.5.2. Avaliação da Influência do Tipo de Papel Suporte	59
3.5.3. Preparo de Amostras	59
3.6. Esterilizador	59
3.7. Ciclo de Esterilização.....	60
3.8. Exposição dos Esporos ao Óxido de Etileno	61
3.8.1. Padronização dos Indicadores Biológicos	61
3.8.2. Avaliação da Performance dos Indicadores Biológicos X Condições de Armazenamento	61

3.8.3. Avaliação da Influência do Tipo de Papel Suporte	62
3.9. Teste de Esterilidade	62
3.10. Cuidados nos Procedimentos Microbiológicos	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. Produção dos Indicadores Biológicos	65
4.2. Avaliação do Teor de Umidade dos Indicadores Biológicos	66
4.3. Avaliação da Resistência dos Indicadores Biológicos.	68
4.3.1. Padronização dos Indicadores Biológicos.....	68
4.3.2. Avaliação da Performance dos Indicadores Biológicos X Condições de Armazenamento	68
4.3.3. Avaliação da Influência do Tipo de Papel Suporte	78
4.5.4. Tempo de Esterilização	80
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
7. APÊNDICES.....	102
Apêndice 1. Preparo da Amostra-Teste (Fita Carregadora + Suporte de Papel + Embalagem de Alumínio).....	103
Apêndice 2. Preparo da Amostra-Teste (Fita Carregadora + Suporte de Papel + Embalagem de Alumínio).....	103
Apêndice 3. Armazenamento dos IBs (Fitas Carregadoras) - sob Refrigeração.....	104
Apêndice 4. Armazenamento dos IBs (Fitas Carregadoras) - sob Refrigeração + UR Controlada.....	105
Apêndice 5. Armazenamento da Amostra-Teste -sob Refrigeração + UR Controlada.....	106
Apêndice 6. Esterilizador por Óxido de Etileno.....	107
Apêndice 7. Posicionamento das Amostras-Testes na. Carga. de Esterilização.....	107
Apêndice 8. Carga de Esterilização.....	108
Apêndice 9. Avaliação Estatística dos Resultados de Resistência de IBs.....	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resistência ao Óxido de Etileno de Vírus (CAPUTO and ODLAUG, 1983).....	9
Tabela 2: Resistência ao Óxido de Etileno de Células e Esporos Bacterianos (CAPUTO and ODLAUG , 1983)..	10
Tabela 3: Resistência (Valor D - em minutos) de Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> (<i>globigii</i>) em Diferentes Materiais de Suporte (CAPUTO and ODLAUG, 1983).....	16
Tabela 4: Limites Máximos de Resíduos em Correlatos em ppm (PORTARIA INTERMINISTERIAL nº 4, 1991).....	20
Tabela 5: Constantes e Pesos Moleculares para Misturas EO/Diluyente (AAMI, 1987a).....	48
Tabela 6: Constantes dos Gases - $R = PV/nT$ (AAMI, 1987a)..	48
Tabela 7: Teor Médio de Umidade dos IBs.....	67
Tabela 8: Teor Médio de Umidade em Papéis.....	67
Tabela 9: Avaliação de Resistência de IBs, usando Câmara BIER.....	68
Tabela 10: Resultados do Teste de Esterilidade dos IBS A1, A2, B1, B2, C1 e C2.....	69
Tabela 11: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB Produzido a partir do IB AMSCO, Armazenado sob Refrigeração (IB A1).....	72

Tabela 12: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB Produzido a partir do IB AMSCO, Armazenado sob Refrigeração e Umidade Relativa Controlada (IB A2).....	73
Tabela 13: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB Produzido a partir de Cepa da Coleção de Culturas Armazenado sob Refrigeração (IB B1).....	74
Tabela 14: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB Produzido a partir de Cepa da Coleção de Culturas Armazenado sob Refrigeração e Umidade Relativa Controlada (IB B2).....	75
Tabela 15: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB AMSCO, Armazenado sob Refrigeração (IB C1).....	76
Tabela 16: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB AMSCO, Armazenado sob Refrigeração e Umidade Relativa Controlada (IB C2).....	77
Tabela 17: Resultados do Teste de Esterilidade dos IBs D1, D2 e D3.....	79
Tabela 18: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno dos IBs D1, D2 e D3.....	79
Tabela 19: Condições de Processo dos Ciclos de Esterilização por Óxido de Etileno.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Inativação de Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> (<i>globigii</i>) a diferentes concentrações de Óxido de Etileno, a 117,5 ^o C e 40% UR (CAPUTO and ODLAUG, 1983).....	12
Figura 2: Inativação de Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> (<i>globigii</i>) a diferentes umidades relativas (25-75%), a 500 mg/l de Óxido de Etileno e 117,5 ^o F (CAPUTO and ODLAUG, 1983).....	13
Figura 3: Inativação de Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i> (<i>globigii</i>) a diferentes temperaturas, a 500 mg/l de Óxido de Etileno, a 117,5 ^o C e 40% UR (CAPUTO and ODLAUG, 1983).....	14
Figura 4: Cinética de morte de microrganismos (AAMI, 1991c)	17
Figura 5: Áreas na Curva de Morte analisadas pelos diferentes métodos de determinação de D.....	40
figura 6: Desenho do processo de esterilização, usando teste de processo reduzido (AAMI, 1991c).....	41
Figura 7: Ciclo de Esterilização por Óxido de Etileno	54

NOMENCLATURA

- D Tempo de redução decimal. Tempo para reduzir em 90% concentração inicial de microrganismos.
- Q_{10} Relação da constante de velocidade de reação, à temperatura $T+10^{\circ}\text{C}$ e da constante de velocidade de reação à temperatura T . Ou seja, expressa o aumento da velocidade da reação com aumento de 10°C .
- AAMI Association for the Advancement of Medical Instrumentation
- ATCC American Type Collection Culture
- BIER "Biological Indicator - Evaluator Resistometer "
- C Concentração de Óxido de Etileno
- CFC Clorofluorcarbono
- DP Desvio-padrão
- DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
- EO Óxido de Etileno
- ETCH Etilenocloridrina
- ETG Etilenoglicol
- EUCOMED European Confederation of Medical Industry
- IB Indicador Biológico
- GMP " Good Manufacturing Procedures " - Boas Normas de Fabricação
- h Hora

HCFC Hidroclorofluorcarbono
 LAL "Limulus Amebocyte Lysate"
 M Média
 min Minuto
 ml Mililitro
 NMP Número mais provável
 N₂ Nitrogênio
 PVC Cloreto de polivinileno
 rpm Rotações por minuto
 t Tempo
 T Temperatura
 TSA "Tryptic Soy Agar " - agar de soja tripticaseína
 TSB "Tryptic Soy Broth " - caldo de soja tripticaseína
 UFC Unidade Formadora de Colônia
 UR = RH Umidade Relativa
 USP The United States Pharmacopeia
 VP Voges Proskauer

RESUMO

Entre os poucos métodos de esterilização conhecidos para produtos e materiais termo-sensíveis, o Óxido de Etileno é bastante difundido, especialmente no ambiente hospitalar.

Além dos cuidados que devem ser tomados no uso deste gás, são estudados vários parâmetros (concentração de gás, temperatura, umidade relativa, tempo de exposição e material de suporte) que influenciam sua atividade antimicrobiana. Além destes fatores, há a variabilidade inerente a microrganismos que deve ser considerada quando se estuda Indicador Biológico para processos de esterilização.

Neste trabalho avaliou-se a resistência ao Óxido de Etileno (em mistura com nitrogênio - 45%E₂O/55%N₂) de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) fixados em tiras de papel (fitas carregadoras) produzidos a partir de Indicador Biológico americano (AMSCO) e a partir de esporos liofilizados de Coleção de Culturas alemã (DSM). Verificou-se que não há diferença significativa (com 95% de nível de confiança) entre estas duas fontes de esporos.

Os Indicadores Biológicos produzidos pela metodologia deste experimento estão padronizados (dentro dos limites dado pela USP XXII, 1990 e AAMI, 1986), porém com diferença significativa (95% de nível de confiança) e resistência menor (16-37%) quando comparados ao Indicador Biológico AMSCO. Este resultado levou à avaliação do papel suporte, substituindo o utilizado por papel de menor gramatura e higroscopicidade, não sendo observado diferença significativa entre os dois tipos de papel testados.

Sendo a umidade dos esporos fator importante na definição da resistência de Indicadores Biológicos, estudou-se ainda a influência do armazenamento dos Indicadores Biológicos, comparando a refrigeração ($5-7^{\circ}\text{C}$) e refrigeração + umidade relativa controlada ($5-7^{\circ}\text{C}$, 75,7% UR), não sendo observada diferença significativa (com 95% de nível de confiança) entre estes armazenamentos.

Na avaliação dos resultados, comparou-se duas metodologias de cálculo de resistência de Indicador Biológico (método de Stumbo, Murphy and Cochran, 1950 - D_S e Epstein-Hachigian, 1991 - D_H), não sendo verificado diferença significativa (com 95% de nível de confiança) entre os métodos.

Os valores de redução decimal (valor D) obtidos para os Indicadores Biológicos produzidos variaram de 16 a 24 minutos, enquanto que os Indicadores Biológicos AMSCO forneceram resultados de 25 a 29 minutos.

Para as características de processo aqui estudadas, as condições de esterilização definidas foram:

$$\begin{aligned} T &= 27-32^{\circ}\text{C} \\ \text{UR} &= 67-81\% \\ C &= 694-720 \text{ mg/l} \\ t &= 6 \text{ h} \end{aligned}$$

SUMMARY

Within the few known sterilization methods for thermosensitive materials and products, the use of Ethylene Oxide has been widespread, mainly in the hospital environment.

Besides Ethylene Oxide carefull handling requirements, several parameters that may influence antimicrobial activities are being studied (gas concentration, temperature, relative humidity, exposure time and support material). In addition to these factors, variability must also be considered when biological indicators for sterilization processes are studied.

In this study it was evaluated resistance to Ethylene Oxide (mixed to nitrogen - 45%EO/55%N₂) of *Bacillus subtilis* var.*niger* (*globigii*) spores in strips of paper (carrier strips) produced from American Biological Indicator (AMSCO) and from lyophilized spores of german culture collection (DSM). There were no significative differences (95% accuracy) observed between these two spores sources.

The Biological Indicators produced by the methodology of this experiment are standardized (within the limits stated by USP XXII 1990 and AAMI, 1986) but have a significative difference (95% accuracy) and lower resistance (16-37%) if compared to AMSCO Biological Indicator. This conclusion has led to an evaluation of support paper, substituting the one used by another one of less gramature and hygroscopicity. No significative differences were found between them.

Since spore humidity is very important to define resistance of biological indicators, further studies were made about influence of Biological Indicators storage by comparing refrigeration

conditions (5-7 °C and controlled refrigeration + relative humidity (5-7°C, 75,7% RH. No significative differences (95% accuracy) were found.

Comparing the two calculation methodologies of biological indicators resistance (Stumbo, Murphy and Cochran, 1950 and Epstein-Hachigian, 1991 methods) no significative differences (95% accuracy) were found in the results evaluation.

The decimal reduction (D value) for the produced Biological Indicator varied from 16 to 24 minutes, while AMSCO Biological Indicators had values from 25 to 29 minutes.

For the process, subject to this study, the defined sterilization conditions were:

T = 27- 32 °C
UR = 67- 81 %
C = 694-720 mg/l
t = 6 h

1. INTRODUÇÃO

Esterilização é um termo absoluto que significa a destruição de toda forma de vida, isto é, a morte de bactérias, fungos, vírus e esporos. A esterilização é um dos processos mais utilizados na preservação de alimentos em função da sua confiabilidade e viabilidade econômica; porém, não é aplicada até a exaustão da população microbiana devido a termosensibilidade dos alimentos. Na área médico-hospitalar é um processo obrigatório para artigos críticos - aqueles que penetram através da pele e mucosas, atingindo os tecidos sub-epiteliais e no sistema vascular, bem como todos os que estejam diretamente conectado com este sistema (PORTARIA nº 930, 1992).

Os agentes esterilizantes são classificados como físicos ou químicos. Como agentes físicos tem-se o calor seco ou úmido, a radiação - ionizante e não ionizante - e a filtração. Dentre os agentes químicos, tem-se o óxido de etileno, o glutaraldeído e o formaldeído (RUSSEL et alii, 1982; BLOCK, 1983). Novas tecnologias estão sendo avaliadas, usando como agente esterilizante o peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro, plasma, microondas e ozônio (MORRISSEY & PHILLIPS, 1990; ROSENBERG & BOGI, 1987; KNAPP et alii, 1986).

O procedimento selecionado para a esterilização depende da natureza do material e das dificuldades impostas pela grande diversidade de produtos. O conhecimento do tipo, teor e fonte dos contaminantes nos produtos, antes da esterilização, e a aplicação de métodos para minimizar tal contaminação e preveni-la pós processamento contribuem para assegurar o êxito da esterilização. Além da eficiência e otimização dos processos de esterilização, conhecimento e cuidados na manutenção das características físico-químicas, funcionalidade e biocompatibilidade dos produtos esterilizados devem ser observados.

Assim, a esterilização industrial apresenta-se como um desafio no desenvolvimento de equipamentos, instrumentos, controles, monitoradores e novos agentes esterilizantes.

Observa-se que a esterilização de produtos termo-sensíveis é realizada principalmente por óxido de etileno e radiação. No Brasil, a esterilização de produtos médicos e alimentícios por radiação é bastante limitada e centralizada na região sul e sudeste do país, em função do alto custo inicial de implantação de uma unidade de radiação, além dos custos de manutenção e controles. A esterilização por óxido de etileno é mais difundida, principalmente no ambiente hospitalar, apesar dos cuidados que devem ser tomados no uso deste gás (MAIER et alii, 1991; ELLIS, 1990).

Na literatura, alguns trabalhos ilustram a avaliação de resistência do Indicador Biológico - *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) - frente ao óxido de etileno e os diversos parâmetros que influenciam a sua atividade antimicrobiana (DADD et alii, 1983; REICH, 1980a, 1980b; PEDERSEN & HANSEN, 1989; DADD & DALEY, 1982; MULLICAN & HOFFMAN, 1968; DOYLE & ERNST, 1967, 1968; KERELUK et alii, 1970a, 1970b, 1970c; DOYLE et alii, 1970; GILBERT et alii, 1964; CHRISTENSEN & KRISTENSEN, 1979; MARLETTA & STUMBO, 1970; ERNST & SHULL, 1962a, 1962b). Além disto, propostas recentes de eliminação do uso de clorofluorcarbonos (composto que reconhecidamente causa danos à camada de ozônio) leva à necessidade de outros gases inertes como substituto. Como a maior parte dos esterilizadores à óxido de etileno utiliza mistura de óxido de etileno e clorofluorcarbono, poucos resultados se têm da resistência à óxido de etileno de diferentes misturas gasosas (LIU et alii, 1968; MARLETTA & STUMBO, 1970).

Baseado nestas constatações e no desenvolvimento de equipamentos e novas misturas gasosas de óxido de etileno, reconhece-se a importância do estudo da resistência de Indicadores Biológicos,

comparando-se os modelos cinéticos de destruição microbiana das misturas tradicionais (óxido de etileno + freon) com as que empregam gases inertes (como nitrogênio).

Neste trabalho pretendeu-se:

. avaliar a resistência ao óxido de etileno (em mistura com nitrogênio - 45%E₂O/55%N₂) de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) em tiras de papel (fitas carregadoras), produzidos a partir de Indicador Biológico comercial americano (AMSCO) e a partir de cepa liofilizada de Coleção de Culturas alemã (DSM).

. comparar a performance do Indicador Biológico produzido com relação ao Indicador Biológico padronizado (americano).

. verificar a influência das condições de armazenamento (refrigeração e refrigeração + umidade relativa controlada) na resistência do Indicador Biológico.

. avaliar a influência do tipo de papel usado como suporte na resistência do Indicador Biológico.

. definir tempo de esterilização para as condições de processo estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Evolução Histórica

A evolução dos processos de esterilização confunde-se com a própria evolução da Microbiologia. Alguns métodos práticos para se conseguir evitar a putrefação ou deterioração já eram utilizados muito antes de se conhecer o papel dos microrganismos nestes processos. Alimentos perecíveis eram conservados através da secagem ou adição de sal. Há 4000 anos a.C., os egípcios usavam uma mistura de óleos essenciais para embalsamar seus mortos. Os persas, no ano 500 a.C., conservavam sua água em recipientes de prata. Em 1546, o italiano Francastoro, mais tarde conhecido como o primeiro epidemiologista, postulou a idéia de que o contágio era devido a agentes vivos. Em 1825, no campo dos desinfetantes, Lebarraque recomendava o uso de hipoclorito como anti-putrefativo para cadáveres no necrotério de Paris. Em 1839, Davis usava o iodo para tratamento de feridas contaminadas. Em 1847, Semmelweiss, um obstetra húngaro, conseguiu diminuir os casos de febre puerperal num hospital de Viena, ao instituir a desinfecção das mãos com água clorada das pessoas que assistiam as operações. Essa é considerada a primeira grande contribuição para a higiene e desinfecção hospitalares (MACCLELLAND, 1976).

Por volta de 1880, a fervura era utilizada para "esterilizar" os materiais , incluindo roupas. Porém, quando Bastian mostrou que certos microrganismos, como esporos de *Bacillus subtilis*, descorberto por Cohn em 1876, resistiam à fervura prolongada, verificou-se a necessidade de se elevar a temperatura acima de 100°C para garantir a esterilidade dos produtos. O primeiro esterilizador à vapor d'água sob pressão (autoclave) foi projetada por Charles Chamberland, colaborador de Louis Pasteur, também responsável pela invenção do filtro bacteriano de porcelana (PERKINS, 1983).

Kinyon, um bacteriologista americano, estudou desinfetantes gasosos, principalmente formaldeído. Ele foi responsável pelo desenvolvimento de um equipamento que usava formaldeído como agente desinfetante e vapor d'água para manter a temperatura da câmara por volta de 90°C (PERKINS, 1983).

O óxido de etileno, utilizado inicialmente contra insetos no início do século, foi reconhecido como agente antibacteriano em 1929 e por volta de 1949 foi aceito como agente esterilizante (BRUCH, 1961; HAWLEY, 1982; MACCLELLAND, 1976).

O uso de radiação para esterilização de produtos médicos foi iniciado em escala industrial no ano de 1956, através da utilização de elétrons de alta energia, produzidos por um acelerador de Van de Graaf (MACCLELLAND, 1976).

Neste século, portanto, a ciência da esterilização teve uma evolução muito grande, culminando com a tecnologia da esterilização por radiação e vem progredindo com estudo de novos agentes esterilizantes, como peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro, plasma e ozônio (MORRISSEY & PHILLIPS, 1990, ROSENBERG & BOGI, 1987).

2.2. Esterilização por Óxido de Etileno

A esterilização gasosa tem sido praticada há muitos anos, sendo o óxido de etileno e formaldeído os agentes mais largamente utilizados (BRUCH, 1961; PHILLIPS, 1968, 1977). Outros gases como brometo de metila (CH_3Br), óxido de propileno ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) e beta-propiolactona ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$) são utilizados em procedimentos específicos de esterilização ou desinfecção (BRUCH, 1961).

O formaldeído tem sido utilizado para desinfecção e esterilização, porem apresenta algumas desvantagens como estabilidade da solução estoque, toxicidade, necessidade de gerar e distribuir

uniformemente o gás, formação de polímeros, necessidade de calor e umidade e dificuldade de penetração (RUSSEL et alii, 1982).

O óxido de etileno é utilizado para esterilizar produtos termo ou radio-sensíveis. A esterilização por óxido de etileno é um método comum de esterilização de produtos médicos em indústrias, hospitais, clínicas e laboratórios (MAIER et alii, 1991). Na indústria de alimentos, o óxido de etileno é utilizado para fumigação de vários produtos sensíveis ao calor, como condimentos (RUSIG & YOKOYA, 1978; FARKAS & ANDRASSY, 1988; FRANCO et alii, 1986).

Recentemente porém, limitações estritas relativas à concentração de óxido de etileno em locais de trabalho e aos níveis residuais de óxido de etileno e etilenocloridrina em produtos médicos e alimentícios têm sido publicados em vários países. A toxicidade do óxido de etileno e a complexidade do processo de esterilização são razões para restrição do seu uso (PORTARIA INTERMINISTERIAL nº 4, 1991, SAMUELS, 1978).

Os tipos de produtos esterilizados por óxido de etileno e formaldeído e as dificuldades associadas aos processos de esterilização por estes gases são similares. No Brasil, entretanto, não há equipamentos disponíveis de esterilização gasosa por formaldeído, limitando o uso do óxido de etileno para a esterilização gasosa de produtos termo-sensíveis. Além disto, recomendações rigorosas para o controle da eficiência microbiológica da esterilização gasosa tem sido objeto de vários trabalhos, em função dos diversos fatores que influenciam a atividade destes gases e dos monitores (KERELUK et alii, 1970a, 1970b, 1970c; GILBERT et alii, 1964; ERNST & SHULL, 1962a, 1962b; REINIKAINEN, 1986; HASTRUP, 1986).

2.2.1. Propriedades do Óxido de Etileno

O óxido de etileno, também conhecido como oxirano, epoxi-etano e óxido de dimetileno é um gás incolor à temperatura e pressão atmosféricas. A baixas temperaturas, o óxido de etileno é um líquido incolor, com ponto de ebulição de $10,8^{\circ}\text{C}$. Sua fórmula molecular é $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, peso molecular 44,05, odor desagradável, semelhante ao éter, miscível com acetona, éter, benzeno e a maioria dos solventes orgânicos. Sua solubilidade na água é grande, em pH ácido reage formando etilenoglicol e na presença de íons cloro forma uma outra substância, a etilenocloridrina, de reconhecida toxicidade (RUSSEL et alii, 1982; CAPUTO & ODLAUG, 1983).

O óxido de etileno é altamente reativo devido a sua estrutura química, um epóxido, e seu vapor é altamente inflamável e potencialmente explosivo em concentrações superiores a 3% (por volume) no ar. Este risco é eliminado diluindo-se o óxido de etileno com um gás inerte, como dióxido de carbono ou fluorcarbonos (BRUCH, 1961). O clorofluorcarbono (CFC 12) é o diluente tradicional, usado a 88% em peso na mistura (carboxide 12), preferido em pequenos esterilizadores como hospitais e laboratórios, em função da baixa pressão total de trabalho. Porém, este produto é considerado danoso à camada de ozônio e busca-se um substituto, como nitrogênio (ELLIS, 1990; MAIER et alii, 1991) e hidroclorofluorcarbono, sendo o mais promissor o HCFC 124 (JONES & WINEGAR, 1991).

O óxido de etileno pode apresentar autodecomposição em temperaturas elevadas, polimerizando-se facilmente. Este processo libera calor e é acelerado por catalisadores como óxido cúprico. Em misturas com dióxido de carbono ou fluorcarbonos, esta habilidade é diminuída (RUSSEL et alii, 1982).

O óxido de etileno é irritante a partir de 500 ppm, valor muito acima do máximo permitido para exposição ao gás, sem efeito à saúde, que pela legislação brasileira é de 1ppm (equivalente a 1,8 mg de óxido de etileno por metro cúbico de ar) para uma

jornada de 8 horas e para exposição instantânea, a concentração máxima é de 10 ppm para um período de 15 minutos (PORTARIA INTERMINISTERIAL nº 4, 1991).

A toxicidade aguda é do mesmo nível da amônia e os sintomas agudos são irritação no trato respiratório e conjuntivo, dor de cabeça, vertigens e vômitos. A fase líquida e o gás dissolvido em polímeros naturais e sintéticos, como couro, borracha, plástico, pode causar severas irritações na pele. Choques anafiláticos são raros (POOTHULLIL et alii, 1975; DOLOVICH & BELL, 1978; NICHOLLS, 1986). O óxido de etileno é mutagênico (EHRENBURG et alii, 1974) e precauções devem ser observadas para proteger trabalhadores e pacientes contra a exposição ao gás (GILLIS & BRUCH, 1983). O óxido de etileno é carcinogênico para animais quando injetado ou administrado por inalação; no homem, estudos têm associado a exposição ao gás a um aumento do risco de ocorrência de câncer entre trabalhadores (PRAT-MARÍN & SANZ-GALLÉN, 1987).

2.2.2. Atividade Antimicrobiana do Óxido de Etileno

O óxido de etileno é um agente alquilante e a atividade antimicrobiana é sugerida pela reação com grupos nucleofílicos, dentre os quais as proteínas e bases nitrogenadas, formando ligações irreversíveis que impedem a duplicação do material genético, inviabilizando a síntese proteica e, portanto, a multiplicação celular (PHILLIPS, 1977; MICHAEL & STUMBO, 1970; WINARO & STUMBO, 1971). A alquilação é a substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo alquil, causando injúria e/ou morte de células vegetativas e esporos microbianos.

O óxido de etileno é usado como esterilizante pela sua habilidade de inativar todos os tipos de microrganismos (PHILLIPS, 1977). Um resumo de diversas publicações da resistência microbiana e inativação de vírus e bactérias é mostrado nas tabelas 1 e 2, sendo importante considerar que os resultados são de diferentes estudos (CAPUTO & ODLAUG, 1983). Alguns trabalhos mostram que

esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) são mais resistentes ao óxido de etileno que esporos e células vegetativas de outros microrganismos, sendo recomendado como Indicador Biológico de processos de esterilização por óxido de etileno (USP XXII, 1990; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

Outros trabalhos mostram que o óxido de etileno também reduz as atividades pirogênica e de "Limulus Amebocyte Lysate" (PEDERSEN & HANSEN, 1989; REICH et alii, 1984)

Os fatores que afetam a atividade antimicrobiana do óxido de etileno são: concentração de gás, umidade relativa, temperatura, tempo de exposição e material de suporte dos microrganismos (GILBERT et alii, 1964; DOYLE & ERNST, 1967, 1968; KERELUK et alii, 1970a, 1970b, 1970c; ERNST & SHULL, 1962a, 1962b; DOYLE et alii, 1970; MULLICAN & HOFFMAN, 1968).

Tabela 1: Resistência ao Óxido de Etileno de Vírus (CAPUTO & ODLAUG, 1983)

Vírus	Material de suporte	Condições de teste	Umidade Relativa	Concentração de Óxido de Etileno	Redução na Infectividade
Influenza B	Soro de cavalo	60 min- 39 ⁰ F, 95 ⁰ F por 24 h	-	10.000 mg/l	>=10 ^{4,7}
Influenza A	Soro de cavalo	60 min- 39 ⁰ F, 95 ⁰ F por 24 h	-	10.000 mg/l	>=10 ³
Mouse encephalomyelitis	Soro de cavalo	60 min- 39 ⁰ F, 95 ⁰ F por 24 h	-	10.000 mg/l	> 10 ^{2,6}
Equine encephalomyelitis	água	1h, 64-68 ⁰ F	-	10%	> 10 ⁴
Coliphage	água e soro	98 ⁰ F	50	500 mg/l	3,4-6,4 min para 90%
Vaccinia	10% coelho	-	-	1% v/v	10 ⁵

Tabela 2: Resistência ao Óxido de Etileno de Células e Esporos Bacterianos (CAPUTO & ODLAUG, 1983)

Organismo	Material Suporte	Temperatura Teste (°F)	Unidade Relativa (%)	Concentração de Óxido de Etileno (mg/l)	Valor D (min)
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i>	Papel	130	30-50	500	3,5
	Plástico	130	30-50	500	6,7
	Papel	130	60 + - 10	600	2,1-2,4
	Papel	130	65 + - 15	600	2,2-5,8
	Papel	130/140	40-60	540-580	2
	Papel	130	60 + - 10	600 +- 20	3,0-3,4
	Papel	130	50 + - 10	1200	1,8
	Papel	118	40	300/900	7,6/3,5
	Papel	90/150	40	500	13,0/1,6
<i>B. subtilis</i> (ATCC 9524)	Papel	104	30-35	700	14,5-15,3
	Papel	104/176	30-35	700	14,7/0,7
<i>B. coagulans</i>	Papel	86/140	30-35	700	10,4/3,07
<i>B. stearothermophilus</i>	Papel	130	30-50	500	2,6
<i>B. pumilus</i>	Papel	130	30-50	500	2,2
<i>C. botulinum</i>	Papel	104	47	700	11,0/11,5
<i>C. sporogenes</i>	Papel	130	30-50	500	2,8-3,3
<i>Salmonella senftenberg</i>	-	104	11-33	700 +- 20	3,3-5,9
<i>E. coli</i>	-	104	11	700 + - 20	2,9
<i>Streptococcus faecalis</i>	Plástico	130	30-50	500	2,0-3,75
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Papel	86	30-35	700	3,45
<i>Lactobacillus brevis</i>	Papel	86	30-35	700	5,88
<i>Micrococcus radiodurans</i>	Plástico	130	30-35	500	3,0
<i>Aspergillus niger</i>	Papel	86	30-35	700	11*
<i>Hansenula</i>	Papel	86	30-35	700	6*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Papel	86	30-35	700	5,5*

* Tempo para redução de 99,9% da população

2.2.2.1. Efeito da Concentração de Gás

Curvas de sobrevivência para inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) a diferentes concentrações de

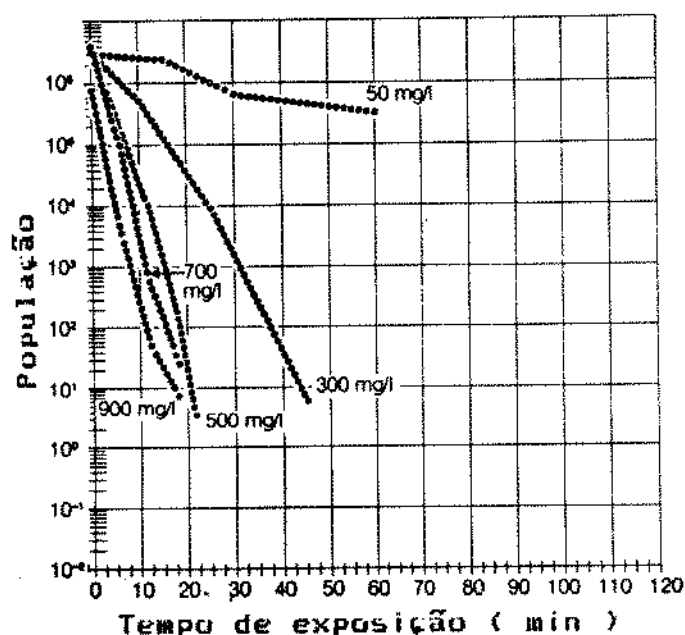
óxido de etileno são mostradas na figura 1 (CAPUTO & ROHNN, 1982), onde se verifica que com o aumento da concentração de gás de 50 a 500 mg/l, a taxa de inativação aumenta significativamente, e com concentrações superiores a 500 mg/l, não há aumento significativo na taxa de inativação de esporos. Quando esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) foram testados para concentrações de gás entre 200 e 1200 mg/l, o decréscimo maior na resistência ocorreu quando a concentração foi aumentada de 200 a 400 mg/l, a 54,4 °C. Na prática, concentrações acima de 400 mg/l são as mais utilizadas (BRUCH, 1961), pois altas concentrações podem aumentar os problemas com resíduos de gás no produto.

A concentração mais indicada deve ser estabelecida em função das características dos produtos - seu poder de adsorção, da letalidade do processo e da integridade das embalagens, pois pressões elevadas podem danificá-las. Além disto, o óxido de etileno deve estar em contato com o produto a ser esterilizado, o que é consequência da permeabilidade da embalagem ao gás. KERELUK et alii (1970c) confirmam a permeabilidade ao óxido de etileno de filme de polietileno de 2, 4 e 6 milímetros de polegada de espessura, sendo que maior período de exposição ao gás é requerido para propiciar sua completa difusão quando se utiliza filmes de polietileno de 20 milímetros de polegada de espessura. DOYLE et alii (1970) mostram que a resistência à óxido de etileno de filmes de polietileno é igual à de cloreto de polivinil e, na ordem de aumento da resistência, têm-se: nylon, laminados de celofane/polietileno e laminados de mylar/polietileno. Diferentes materiais de embalagem de papel, por sua vez, mostra um baixo efeito na resistência dos Indicadores Biológicos ao óxido de etileno (GRAHAM, 1986). As embalagens não aceitas no ambiente hospitalar (AAMI, 1992b), por não serem permeáveis ao óxido de etileno, são aquelas feitas inteiramente dos seguintes materiais: alumínio, celofane, polivinilcloreto (PVC), filme de polipropileno, poliéster, poliamida e cloreto de polivinilideno. Porém, combinação de alguns filmes plásticos ou materiais impermeáveis com outros materiais permeáveis (como papel grau

cirúrgico e TYVEK*) são permitidas e indicadas em casos específicos, como mostram RODRIGUES ALVES & LEITE JANUZELLI (1993).

Além da permeabilidade ao gás, ao se referir à embalagem para produtos estéreis, atenção deve ser dada a sua integridade física como barreira microbiana e alguns testes são descritos na literatura para garantir esta característica (SPITZ, 1994).

Figura 1: Inativação de Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) a Diferentes Concentrações de Óxido de Etileno , a 117,5°F e 40% UR (CAPUTO & ROHN, 1982)



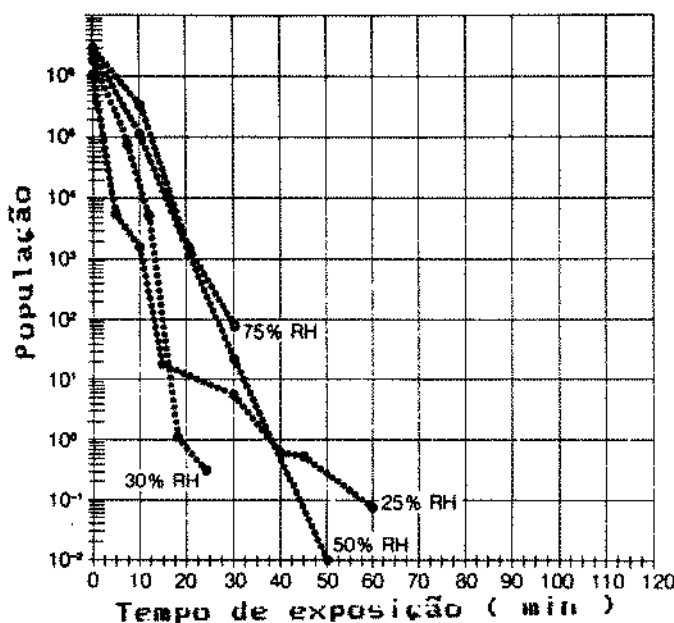
2.2.2.2. Efeito da Umidade Relativa

A umidade relativa (UR) é reconhecida como um fator crítico na esterilização por óxido de etileno (GILBERT et alii, 1964; KERELUK et alii, 1970c). Curvas de sobrevivência do *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) para diferentes umidades relativas são mostradas na figura 2 (CAPUTO & ROHN, 1982).

Um bom efeito microbicida do óxido de etileno é observado em torno de 30% de umidade relativa, com efeito altamente reduzido a baixas umidade relativas e uma redução menor a altas umidades relativas (DOYLE et alii, 1970; KAYE & PHILLIPS, 1949). Na prática, os valores mais aceitos de umidade relativa estão entre 30 e 60%. Umidade relativa em excesso pode promover o aparecimento de resíduos de etilenoglicol e causar danos à embalagem.

KERELUK et alii (1970b) concluíram que o conteúdo de água no microambiente dos esporos tem maior influência na resistência ao óxido de etileno do que a umidade relativa na atmosfera do esterilizador. DOYLE et alii (1970) confirmam esta posição mostrando que esporos dessecados de *Bacillus subtilis* var. *niger* são mais resistentes ao óxido de etileno que esporos não dessecados. Na esterilização por óxido de etileno, a água reagirá com o mesmo, abrindo o anel do epóxido e auxiliando na elevação da temperatura do produto.

Figura 2: Inativação de Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) a Diferentes Umidade Relativas (25-75%), a 500mg/l de Óxido de Etileno e 117,5°F (CAPUTO & ROHN, 1982)



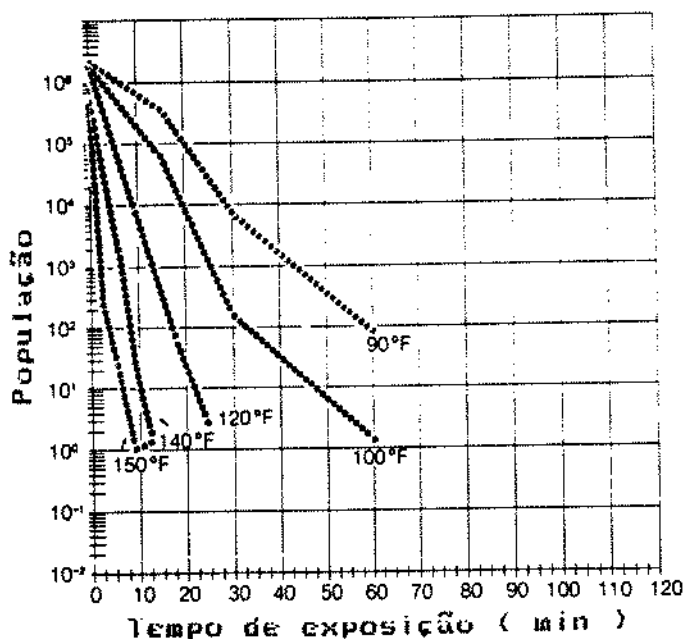
2.2.2.3. Efeito da Temperatura

Avaliação de diversos trabalhos indicam que a cada alteração de 10°C na temperatura, a taxa de inativação de esporos pelo óxido de etileno praticamente dobra - $Q=2(T=10^{\circ}\text{C})$, quando sua concentração não é limitada (ERNST & SHULL, 1962a; LIU et alii, 1968; BLAKE & STUMBO, 1970 e KUZMINSKI et alii, 1969). Inativação de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) a várias temperaturas é mostrada na figura 3 (CAPUTO & ROHN, 1982).

Estudos de distribuição de temperatura são importantes, pois podem explicar as falhas de processo e evitar danos aos produtos e embalagens em pontos de super aquecimento.

O pré-condicionamento da carga a ser esterilizada, com objetivo, entre outros, de elevar a temperatura e umidificar os produtos, é proposto por GILLIS (1982).

Figura 3: Inativação de Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) a Diferentes Temperaturas, a 500 mg/l de Óxido de Etileno e 40% UR (CAPUTO & ROHN, 1982).



2.2.2.4. Efeito do Tempo de Exposição

Para se definir o tempo de exposição ao gás deve-se determinar os parâmetros de processo, a carga microbiana inicial dos produtos e o fator de segurança de esterilidade esperado. O fator de segurança de esterilidade é expresso como potência negativa na base 10. Por exemplo, fator de segurança de esterilidade de 10^{-3} deve garantir a chance de menos de 1 em 1000 que o contaminante sobreviverá no produto exposto ao processo de esterilização (MORRISSEY et alii, 1992).

Tempo de exposição é o tempo de contato com o agente esterilizante (mantidos os demais parâmetros de processo) que assegura o fator de segurança desejado. O início da exposição deve ser dado somente quando todos os parâmetros atingirem o mínimo definido para o processo.

Dados experimentais para diferentes microrganismos indicam que a morte da população a uma variedade de agentes esterilizantes ocorre de forma logarítmica, sendo que a inativação é dada por uma reação de primeira ordem (vide figura 4).

Em muitos casos, a taxa de inativação é constante nos tempos iniciais, enquanto em outros há uma demora ou aceleração antes da reação de primeira ordem ser estabelecida. No primeiro caso, a taxa de inativação é dada pela seguinte equação (QUESNEL, 1984):

$$N = N_0 \cdot e^{-kd}, \text{ onde:}$$

N = número de sobreviventes ao tratamento esterilizante

N_0 = número de viáveis na população inicial

k = constante de inativação

d = dose esterilizante (no caso do óxido de etileno = tempo de exposição ao gás, mantidas constantes as demais variáveis - temperatura, concentração de gás e umidade relativa)

e = 2,71828

Na prática, nem todas as curvas de inativação são logarítmicas, sendo observado curvas côncavas para baixo e côncavas para cima.

2.2.2.5. Efeito do Material de Suporte dos Microrganismos

A resistência dos esporos ao óxido de etileno pode ser afetada pelo material de suporte (BLAKE & STUMBO, 1970 ; CAPUTO & ROHN, 1982).

A diferença da resistência do esporo em diferentes materiais de suporte é mostrada na tabela 3 (CAPUTO & ROHN, 1982). Os diferentes valores D para as mesmas condições de teste podem ser explicados pelas variações nas características de absorção dos materiais.

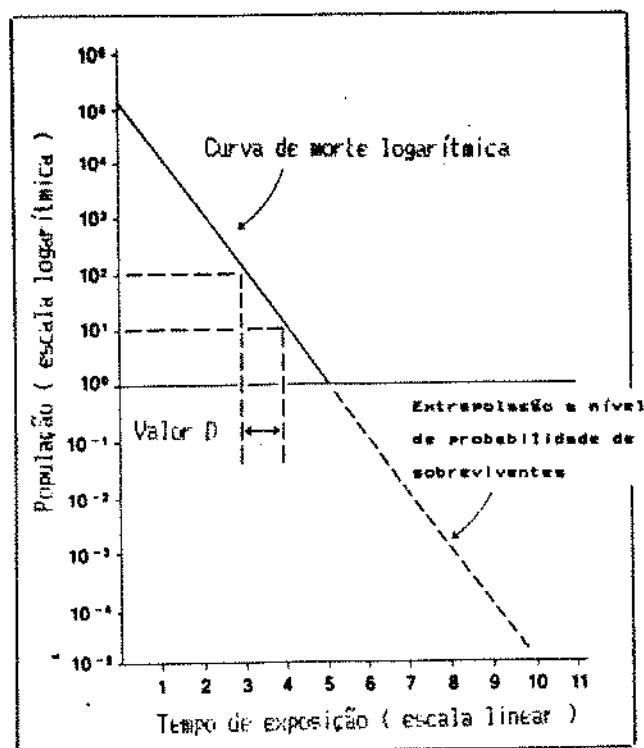
A diferença na resistência não parece ser devido a oclusão dos esporos, uma vez que não há evidência deste fenômeno observado em micrografia de esporos em plástico, papel e alumínio (CAPUTO & ODLAUG, 1983).

Tabela 3: Resistência (Valor D - em minutos) de Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) em Diferentes Materiais de Suporte (CAPUTO & ROHN, 1982)

Material de Suporte	Condições de Teste *			
	300 mg/l 41 °C	de EO 52 °C	600 mg/l 41 °C	de EO 52 °C
Papel	17,0	10,6	7,1	3,7
Membrana de diálise	53,5	12,4	19,4	6,8
PVC (folha)	10,9	4,6	6,3	2,6
Borracha de silicone	5,6	7,6	4,1	4,3
PVC (tubo)	14,5	4,1	4,8	4,4
Suturas de nylon	15,3	3,8	4,3	2,6
Alumínio	26,0	8,8	7,0	4,6
Poliéster	10,0	5,0	5,5	5,5
Borracha natural	10,5	5,2	3,9	1,9
Borracha siliconizada	9,4	5,7	5,9	2,5

* UR = 50%.

Figura 4: Cinética de Morte de Microrganismos (AAMI, 1991c)



2.2.3. Uso de Óxido de Etileno

2.2.3.1. Esterilização por Óxido de Etileno de Produtos Médicos

O óxido de etileno tem sido utilizado desde a Segunda Guerra Mundial em esterilização de produtos médico-hospitalares (CHRISTENSEN & KRISTENSEN, 1979).

Os três elementos básicos a serem considerados na esterilização destes produtos por óxido de etileno são: preparação do produto, definição dos parâmetros de esterilização e a remoção do residual de óxido de etileno.

A produção de produtos médicos deve seguir as Boas Normas de Fabricação (GMP), visando o controle da contaminação. Outros fatores a serem considerados estão relacionados à complexidade do produto, embalagem e configuração da carga. A definição da

complexidade dos produtos para esterilização gasosa deve prover uniformidade de temperatura e umidade relativa.

A definição dos parâmetros de esterilização do produto é um item crítico. Os fatores importantes neste item são (CAPUTO & ODLAUG, 1983):

- produto e sua carga microbiana
- embalagem, carga e massa
- tempo de injeção de gás
- concentração de gás
- tempo de exposição
- umidade relativa da exposição
- tempo de retirada de gás
- uniformidade das condições da carga

A remoção do residual de óxido de etileno em produtos é normalmente realizada em câmaras de aeração com lavagens múltiplas de ar que pode ser aquecido (YOUNG, 1986). De acordo com REICH & HOUGHTLING (1985), a embalagem e o desenho/construção do produto afetam os níveis residuais de óxido de etileno. Uma série de métodos são disponíveis para determinar o residual de óxido de etileno e seus derivados - etilenoglicol e etilenocloridrina (ROMANO & RENNER, 1975; AAMI, 1988b, 1989). Normalmente, as análises destes produtos em ambientes e produtos são realizadas por cromatografia gasosa, sendo que a extração de óxido de etileno é melhor realizada com água (REGO et alii, 1991). Os limites de residual de óxido de etileno em produtos médicos, definidos pela legislação brasileira (PORTARIA INTERMINISTERIAL n^o 4, 1991) estão descritos na tabela 4. Os fatores que têm impacto na remoção do residual deste gás são:

- produto
- embalagem, carga e massa
- concentração de gás durante a exposição
- temperatura (exposição e aeração)

- tempo e ambiente da aeração.

Um material de embalagem para esterilização por óxido de etileno deve, no mínimo (AAMI, 1992b):

- permitir adequada umidificação e penetração ao óxido de etileno
- permitir adequada aeração do conteúdo
- prover uma barreira adequada aos microrganismos
- resistir a rasgos e furos
- prover integridade à selagem
- permitir fácil apresentação asséptica
- ser livre de ingredientes tóxicos

Para avaliação da exposição pessoal (limites oficiais brasileiros descritos no item 2.2.1), são usados dois métodos: tubo de carvão e difusão (BACHMAN, 1991).

Em função do ambiente e da diversidade de materiais, o uso de óxido de etileno em hospitais exige uma série de cuidados que inclui instalação, equipamentos, capacitação de funcionários, recomendações de processo (como recebimento, limpeza e descontaminação de material, embalagem, carregamento, processo, descarregamento, aeração, estocagem e distribuição) e controle de qualidade (AAMI, 1987b, 1992b).

Na esterilização de produtos médicos recomenda-se fator de segurança de esterilidade de 10^{-6} para materiais implantáveis e 10^{-3} para materiais de uso tópico (MORRISSEY et alii, 1992).

Alterações significativas de qualquer elemento descrito deve ser avaliado em termos de influência na letalidade microbiana, toxicidade e segurança de uso e dos trabalhadores.

Tabela 4: Limites Máximos de Resíduos em Correlatos - em ppm
(PORTARIA INTERMINISTERIAL n° 4, 1991)

CORRELATO	BO	ETCH	ETG
Implantes:			
Pequeno (10g)	250	250	5.000
Médio (10-100g)	100	100	2.000
Grande (100g)	25	25	500
Dispositivos intra-uterinos	5	10	10
Lentes intra-oculares	25	25	500
Correlatos que contatam a mucosa	250	250	5.000
Correlatos que contatam o sangue	25	25	250
Correlatos que contatam a pele	250	250	5.000
Esponjas Cirúrgicas	25	250	500

2.2.3.2. Esterilização por Óxido de Etileno de Produtos Alimentícios

Há muitos anos são conhecidos vários gases para matar ou inibir o crescimento dos microrganismos em alimentos. Eles têm sido estudado para determinar o seu potencial relativo ao aumento de vida de prateleira dos alimentos. Destes gases, o uso comercial está restrito ao dióxido de carbono, óxido de etileno, óxido de propileno, dióxido sulfúrico e ozônio (THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD OF IAMS, 1980; MARIN, 1988).

Condimentos e ervas frequentemente contêm grandes quantidades de microrganismos (FRAZIER & WERTHOFF, 1978), que podem ser agentes contaminantes de alguns alimentos processados. A flora microbiana encontrada em condimentos é bastante variada e o interesse na esterilização de condimentos está relacionado com as indústrias de processamento de carne, molhos derivados de tomate, alimentação enteral, entre outras. Usando-se os processos tradicionais de esterilização, como calor, nota-se que grande parte de óleos essenciais existentes em condimentos é eliminada, o que os tornam inadequados para sua finalidade. Utilizando processos indicados para produtos termosensíveis , como

esterilização por radiação gama ou óxido de etileno, este fenômeno é evitado (RUSIG & YOKOYA, 1978; SZABAD & KISS, 1979; KURUPPU et alii, 1985; FRANCO et alii, 1986; FARKAS & ANDRÁSSY, 1988). Algumas indústrias de processamento de carne e molhos têm utilizado óleos essenciais extraídos de condimentos, mas sem bons resultados, o que se deve ao alto preço dos óleos essenciais, ao aparecimento de características sensoriais indesejáveis no produto final e à necessidade de os condimentos em certos produtos serem usados sob a forma de grãos ou pulverizados.

MICHAEL & STUMBO (1970) determinaram a eficiência de esterilização de *Salmonella senftenberg* e *Escherichia coli* liofilizadas e tratadas com 700 mg/l de óxido de etileno à temperatura de 40 °C e umidade relativa variando de 11 a 73% e tempo de exposição de 0 a 6 minutos. Concluíram que a *Salmonella senftenberg* era duas vezes mais resistente quando misturada em ovo desidratado do que quando no estado puro.

RUSIG & YOKOYA (1978) avaliaram a eficiência do óxido de etileno e brometo de metila separadamente e em combinação, variando concentração, umidade relativa, temperatura e período de tratamento, indicando que o tratamento com 360 mg/l de óxido de etileno não foi eficiente na esterilização de pimenta preta, mas 2540 mg/l de brometo de metila foi eficiente. A eficiência aumenta se a combinação destes gases é usada, e a melhor proporção observada foi de 10 partes de brometo de metila e 1 parte de óxido de etileno. A eficiência também aumenta com umidade relativa maior que 50%. O tratamento com uma mistura de 58 mg/l de óxido de etileno mais 540 mg/l de brometo de metila e 17 horas de exposição, e umidade relativa entre 50 e 70% foi o mais promissor para propostas práticas.

DE LA OSA et alii (1991) mostraram que pimentões tratados por óxido de etileno tem carga microbiana menor que aqueles não tratados, sendo que as espécies da família *Enterobacteriaceae*,

mais frequente em pimentões, tem grande grau de sensibilidade ao óxido de etileno.

O óxido de etileno foi utilizado para reduzir contaminação microbiana e matar insetos em vários alimentos secos. Atualmente, nos Estados Unidos, o uso de óxido de etileno é permitido apenas para condimentos, exceto misturas que contém sal, pois na presença deste, óxido de etileno e óxido de propileno podem reagir com organoclorados e formar cloridrinas, que são tóxicas (PHILLIPS, 1977; JORDY, 1981). Na ausência de sal, os produtos prováveis de hidrólise são etilenoglicol e propileno glicol, do óxido de etileno e óxido de propileno, respectivamente. O resíduo de gás nos produtos não deve exceder 50 ppm. Canadá e outros países tem especificações similares (INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD OF IAMS, 1980). No Reino Unido e outros países, a esterilização por óxido de etileno tem sido descontinuada e novas alternativas propostas (DARRINGTON, 1991; SCHNEIDER, 1993).

A esterilização de alimentos por radiação gama e óxido de etileno são competitivas do ponto de vista de eficácia microbiana e na manutenção das características de qualidade como aroma, cor, sabor (SZABAD & KISS, 1979; FRANCO et alii, 1986 e FARKAS & ANDRÁSSY, 1988). A esterilização por radiação gama exige investimento inicial, de acompanhamento e manutenção grandes, se restringindo a grandes empresas (grandes volumes de produção), além da resistência pública em aceitar alimentos irradiados (no Brasil há apenas um prestador de serviços para irradiação de alimentos). A esterilização por óxido de etileno, apesar de exigir controles de eficácia do processo e residual no produto e ambiente, é mais difundida no país, especialmente para condimentos, farinhas e misturas em pó.

2.2.4. Indicadores Biológicos nos Processos de Esterilização por Óxido de Etileno

Indicador Biológico (IB) é uma suspensão que contém microrganismos vivos, de preferência na forma de esporos, de reconhecida resistência ao processo de esterilização definido, fixados em um suporte. Esta resistência deve ser conhecida e obedecida, sendo que uma série de requisitos de produção, acondicionamento e uso devem ser seguidos. Para assegurar que estes microrganismos são diretamente expostos a todos os parâmetros do processo de esterilização, a suspensão geralmente é fixada em objetos (como tiras de papel, alumínio, vidro ou plástico), denominados suportes ou carregadores (SPICHER, 1988). Em alguns casos, os microrganismos podem ser fixados em unidades representativas do lote a ser esterilizado (produto inoculado) ou unidades similares (produto similar inoculado) - USP XXII, 1990.

Os Indicadores Biológicos são usados na qualificação da operação física de esterilizadores, no desenvolvimento e estabelecimento de um processo para produtos e embalagem definidos, além de serem usados para monitorar o ciclo de esterilização (uma vez definido) e periodicamente no programa de revalidação de processo/esterilizador (USP XXII, 1990). Ou seja, os Indicadores Biológicos são usados para testar a eficácia do processo de esterilização e do esterilizador pela avaliação da letalidade microbiana do processo (AAMI, 1991b).

Os Indicadores Biológicos são indicadores ideais dos processos de esterilização, pois podem estar localizados dentro das embalagens de produtos, como termopares e indicadores químicos; são indicadores universais, independente de esterilização específica a ser controlada; integram todos os parâmetros esterilizantes envolvidos como tempo, intensidade germicida, condições ambientais (como temperatura e umidade relativa), considerações sobre

embalagem e medem os processos de esterilização diretamente (RUSSEL et alii, 1982). Ou seja, o Indicador Biológico integra todos os parâmetros de esterilização e deve estar sujeito a rígida padronização (AAMI, 1991b).

Após a esterilização, os Indicadores Biológicos são cultivados em meio de cultura apropriado e sobre condições adequadas para o crescimento do respectivo organismo utilizado no teste. Uma vez que os esporos destes microrganismos são mais resistentes ao agente esterilizante do que os microrganismos contaminantes nos produtos a serem esterilizados e estão presentes em quantidades muito superiores aos normalmente encontrados nestes produtos, a demonstração de que os Indicadores Biológicos foram esterilizados é uma forte inferência de que qualquer outro microrganismo presente no produto foi morto durante o processo de esterilização. Assim, testes de Indicadores Biológicos são aceitos com o mesmo grau de confiança de dados de testes de esterilidade diretamente de produtos. Esta inferência, porém, deve ser acompanhada de um rigor estatístico do plano amostral, além de práticas definidas de cultura dos Indicadores Biológicos pós-esterilização (RUSSEL et alii, 1982).

2.2.4.1. Microrganismo Indicador

Esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) é mais frequentemente utilizado como Indicador Biológico para processo de esterilização por óxido de etileno, por ser o organismo conhecido mais resistente e mais fácil de manipular (DADD & DALEY, 1980; CHRISTENSEN & KRISTENSEN, 1979; KERELUK et alii, 1970a; GRAHAM, 1986). Este indicador pode ser na forma de de microrganismos inoculados diretamente no produto, ou mais normalmente, em papel ou alumínio (suporte com concentração na ordem de 10^6 esporos/suporte).

Este microrganismo quando examinado microscopicamente consiste de células de 0,7 a 0,8 um de largura e 2 a 3 um de comprimento; os endoesporos são ovais e centrais e as células não são inchadas; quando incubados aerobicamente em meio apropriado à 30-35°C, crescimento ocorre em 24 h e meio similar inoculado e incubado a 55-60°C não mostra evidência de crescimento no mesmo período; colônias em agar têm aparência opaca e pode ser creme ou marrom; quando incubadas em caldo nutriente desenvolve uma película e mostra pequena ou nenhuma turbidez (USP XXII, 1990).

As características bioquímicas do *B. subtilis* var. *niger* (*globigii*) ATCC 9372 dado por GORDON et alii (1973) são as seguintes:

- . Gram : +
- . Motilidade: +
- . Catalase: +
- . Crescimento anaeróbico: -
- . Reação Voges-Proskauer: +
- . pH em caldo VP: 5,4
- . Temperatura de crescimento: 10 - 50°C
- . Reação Egg-Yolk: -
- . Crescimento em lisozima: +
- . Crescimento em NaCl (7%): +
- . Crescimento em meio a pH 5,7: +
- . Produção de ácido a partir da glucose: +
- . Produção de ácido a partir da arabinose: +
- . Produção de ácido a partir da xilose: -
- . Produção de ácido a partir da manitol: +
- . Produção de pigmento preto a partir da glucose: -
- . Produção de pigmento preto a partir da tirosina: +
- . Hidrólise de amido: +
- . Hidrólise de hipurato: -
- . Uso de citrato: +
- . Uso de propionato: -

- . NO_2 a partir de NO_3 : +
- . Decomposição de caseína: +
- . Decomposição de tirosina: -

As características importantes e diferenciadoras desta cepa em relação à da grande maioria de cepas de *B. subtilis* var. *niger* é a não produção de ácido a partir da xilose e a produção de pigmento a partir de tirosina.

O desenvolvimento e manufatura comercial de um Indicador Biológico reprodutível é um processo complexo que requer pesquisa e desenvolvimento extensivo, assim como um rígido controle de qualidade (GRAHAM, 1986). Várias orientações são dadas na padronização da produção de Indicadores Biológicos para óxido de etileno e o método de DADD & DALEY (1980) tem sido usado em outros trabalhos (DADD & DALEY, 1982; DADD et alii, 1983).

2.2.4.2. Fatores que Afetam a Resistência do Indicador Biológico

A performance dos Indicadores Biológicos é marcadamente influenciada pelo microrganismo usado, condições durante esporulação, procedimentos de limpeza, procedimentos de preparação e inoculação, materiais de suporte e embalagem, assim como a subsequente avaliação e uso do Indicador Biológico, incluindo metodologia e condições ambientais durante recuperação dos esporos expostos ao agente esterilizante (GRAHAM, 1986).

De acordo com QUESNEL (1984), os fatores que afetam a resistência de Indicadores Biológicos podem ser classificados pelo seguinte critério:

- resistência determinada genotipicamente
- influências ambientais durante crescimento e esporulação
- ambiente durante estocagem
- influência do ambiente durante esterilização
- influência das condições de recuperação

2.2.4.2.1. Resistência Determinada Genotipicamente

A base genética na variação da resistência de Indicadores Biológicos não é bem conhecida. Resistência a um tipo de esterilizante não está correlacionada necessariamente com resistência a outro tipo de esterilizante. Assim, por exemplo, *B. subtilis* var. *niger* é mais sensível ao calor úmido e *B. stearothermophilus* é mais sensível ao calor seco.

MOSELEY (1984) indica que para o *Deinococcus radiodurans* (mais sensível do que esporos ao calor e mais resistente à radiação), a base genética da resistência é a posse pela célula de código genético para reparo de enzimas e outras proteínas que cooperam para reverter a injúria.

2.2.4.2.2. Influência Ambiental Durante Crescimento e Esporulação

Meio de esporulação, tempo e temperatura de incubação afetam o desenvolvimento e resistência de *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* var. *niger* à vapor d'água e óxido de etileno, respectivamente. Procedimentos de lavagem e colheita têm um efeito significativo na característica dos Indicadores Biológicos e reprodutibilidade da preparação de esporos (GRAHAM, 1986). O ambiente iônico durante condições de crescimento também afeta a resistência de *B. subtilis* (PFEIFFER & OTTO, 1986).

Efeitos de diferentes procedimentos de lavagem de esporos de *Bacillus subtilis* na resistência ao calor foi avaliado por GORMAN et alii (1985), observando uma redução na resistência térmica do esporo devido repetidas lavagens, indicando um efeito nas estruturas externas dos esporos. Estes mesmos autores, em outro estudo observaram um leve aumento de ácido dipicolínico nos esporos de *Bacillus subtilis* após desenvolvimento dos resistentes ao calor e um aumento na resistência térmica e química após incubação prolongada em meio de esporulação, o que indica um

envolvimento da camada exterior (GORMAN et alii, 1984). Alguns autores acreditam que a aquisição de resistência ao calor está relacionada com depósito de camada de polipeptídeos do envelope do esporo e maturação (JENKINSON et alii, 1981).

LEVINSON & HYATT (1964) mostraram que a adição de L-fenilalanina aumenta o conteúdo de ácido dipicolínico e a resistência ao calor de esporos de *B. cereus*, enquanto a adição de L-glutamato e L-prolina reduz a resistência dos esporos de *B. megaterium*.

O meio de esporulação influencia a estrutura e composição química dos esporos (SLEPECKY & FOSTER, 1959; LEVINSON & HYATT, 1964; HITCHINS et alii, 1972) e o tamanho dos esporos, com alto conteúdo de proteína, nos esporos menores (HITCHINS et alii, 1972), provavelmente refletido em diferenças em suas coberturas e o volume do cortex dos esporos (BAYLISS et alii, 1981).

DADD & DALEY (1982) sugerem que a presença de grupos alquilatáveis livres nas capas dos esporos (alquilação não letal) pode constituir em um mecanismo de resistência ao óxido de etileno. Espera-se características de resistências diferentes em capas de esporos com diferentes composições conseqüentes do desenvolvimento do microrganismo em meios diferentes, com diferenças no número de grupos alquilatáveis. Aguarda-se assim, que qualquer tratamento que altere a capa do esporo, alterará a resistência do esporo, como mostra KEYNAN et alii (1964), em que o aquecimento de esporos bacterianos a 80°C por 10 minutos, aumentou a permeabilidade da cobertura do esporo, tornando-os menos resistentes.

Resistência dos esporos é afetada pela temperatura durante esporulação (WARTH, 1978) e por concentrações adequadas de cátions, em particular Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mn^{2+} (LEVINSON & HYATT, 1964).

DADD et alii (1983) mostraram que o meio de esporulação, o meio de suspensão, condições de pasteurização e estoque influenciam a resistência de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ao óxido de etileno, porém, temperatura de incubação e idade da cultura de esporulação não parece ser expressiva nesta resistência. As condições sobre as quais a suspensão de esporos é seca no meio suporte do monitor exerce uma influência maior na resistência. Inclusão de glicerol no meio reduz a resistência consideravelmente. Condições nutricionais, pH e temperatura de incubação influenciam a habilidade dos sobreviventes de formar colônias no meio solidificado.

2.2.4.2.3. Ambiente Durante Estocagem

A idade dos esporos e as condições de estocagem são itens importantes na sua resistência.

LEE & ORDAL (1963) descrevem que estocagem de esporos de *Bacillus megaterium* à 3°C por 40 dias resulta em conteúdo dobrado de aminoácido livre do protoplasto do esporo, sendo possível que alterações similares na estrutura química ocorra a -20 °C, resultando em alterações no número de grupos alquilatáveis e consequente alteração na resistência ao óxido de etileno.

Dados reportados por SMITH et alii (1976) mostram um decréscimo na resistência ao calor de Indicadores Biológicos de *Bacillus stearothermophilus* estocados à temperatura ambiente (22°C, 50% UR) e sob refrigeração (4°C, < 1% UR), sendo o decréscimo maior observado naqueles organismos armazenados à temperatura ambiente.

REICH (1980b) não verificou consequências similares ao estudar a estabilidade de Indicadores Biológicos de *Bacillus subtilis*. O estado dormente de esporos de *Bacillus subtilis*, secos em suporte de papel, parecem ser mais estáveis quando estocados à temperatura ambiente ou sob congelamento do que os esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Contrariamente aos dados de SMITH et alii

(1976) , os dados de REICH (1980b) mostram que não há decréscimo significativo, com 95% de nível de confiança, na viabilidade ou resistência de Indicadores Biológicos de *Bacillus subtilis* estocados por 24 meses à temperatura ambiente (20-22°C, 30+-10 % UR) ou sob condições de congelamento (-20°C).

O conteúdo de água dos organismos estocados é um fator importante na resistência ao óxido de etileno e calor seco. Esporos hidratados são menos resistentes ao óxido de etileno do que esporos dessecados (GILBERT et alii, 1964; KERELUK et alii, 1970; REICH, 1980b; REICH & MORIEN, 1982). Esta resistência induzida por dessecação não é permanente e os esporos reagem normalmente quando totalmente reidratados (GILBERT et alii, 1964). Enquanto valores de umidade relativa mínima de 30% são requeridos para efeito letal de óxido de etileno, organismos que são equilibrados a condições de umidade relativa muito menores por dessecação prévia tornam-se resistentes ao gás (PHILLIPS, 1977). Esporos secos em folha de alumínio de uma suspensão estoque de metanol/água (9:1) são menos resistentes do que aqueles secos em suspensão de água (DADD et alii, 1983).

ODLAUG et alii (1981) verificaram que a liofilização de esporos (em tampão-fosfato 0,067M, estocagem a 2-8°C, por 9-27 meses) não tem nenhum efeito na resistência ao calor de *Bacillus subtilis*, apesar de resultar em leve decréscimo da população ($\leq 0,3$ redução logarítmica), concluindo que a liofilização é uma boa alternativa para estocagem de esporos que serão usados como Indicadores Biológicos em processos de esterilização.

2.2.4.2.4. Influência do Ambiente Durante Esterilização

O ambiente durante a esterilização afeta diretamente o grau de dano das células e depende de cada agente esterilizante. Como já descrito, a eficiência da esterilização por óxido de etileno é determinada pela concentração de gás, umidade relativa, temperatura, tempo de exposição e material de suporte.

Umidade relativa entre 30-35% mostra efeito máximo na esterilização por óxido de etileno. Porém, mesmo a estes valores ótimos de umidade, a esterilidade é afetada se os esporos são pré-secos, como mostra DADD & DALEY (1980). Células de *Streptococcus faecium* e *Staphylococcus epidermidis* secos do caldo de cloreto de cálcio a 20 °C por 48 h torna-se três vezes mais resistente ao óxido de etileno do que esporos de *B. subtilis* var. *niger* não secos.

Quando o microrganismo indicador é seco em materiais de suporte absorventes ou higroscópicos, como papel ou tecido, os organismos exibem maior resistência do que alumínio ou vidro (WINGE-HEDEN, 1963; GILBERT et alii, 1964). Esta conclusão, porém, não foi verificada por GRAHAM (1986), que mostra que *B. subtilis* var. *niger* pode ser inoculado em suportes de papel e alumínio, sem efeitos adversos nas características de performance.

Esporos de *Bacillus subtilis* ocluídos em cristais insolúveis em água não são inativados pelo óxido de etileno (DOYLE & ERNST, 1967). Esporos ocluídos em cristais solúveis em água são também difíceis de serem inativados por óxido de etileno (MULLICAN & HOFFMAN, 1968). Entretanto, os esporos podem ser mortos quando os cristais são dissolvidos em água ou quando a pressão parcial da umidade relativa ao redor dos cristais excede a pressão de vapor da solução saturada dos cristais, pois os cristais seriam continuamente dissolvidos e refeitos. O efeito protetor dos cristais provavelmente é causado pela inabilidade da molécula de gás em penetrar a matriz do cristal, mais do que a competição pelo gás entre o material cristalino e os esporos embebidos.

2.2.4.2.5. Influência das Condições de Recuperação

Alguns trabalhos mostram que dipicolinato de cálcio aumenta a recuperação da população de esporos de *B. subtilis* (BUSTA & ORDAL, 1964). Os resultados para *B. stearothermophilus* são

variáveis (BUSTA & ORDAL, 1964) e dipicolinato de cálcio incorporado ao meio parece inibir sua germinação e crescimento (FIELDS & FRANK, 1969).

FUTTER & RICHARDSON (1970a) indicaram que o efeito da temperatura de recuperação depende do sistema esterilizante usado. Esporos de *Cl. perfringens* danificados pelo calor mostraram temperatura ótima de recuperação de 27°C, os esporos danificados pela radiação gama pioraram progressivamente no intervalo de 21-41°C e para os esporos danificados por óxido de etileno, taxas de recuperação aumentaram progressivamente no intervalo de 18-38°C.

Esporos aeróbicos e anaeróbicos danificados pelo calor tornam-se sensíveis a concentrações de sal que não causam efeito aos esporos não danificados (COOK & GILBERT, 1969).

A adição de amido e carvão ao meio de cultura de recuperação indica um aumento na recuperação de esporos de *B. stearothermophilus* expostos ao calor (COOK & GILBERT, 1968).

A recuperação de esporos expostos ao óxido de etileno é afetada pelo intervalo de tempo entre o final da exposição e o teste, pela temperatura de estocagem após esterilização e temperatura de incubação, bem como meio de cultura (CAPUTO et alii, 1980). DADD et alii (1983) mostram que a adição de extrato de levedura (1%) a triptona glucose ou caldo nutriente reduz à metade a recuperação, enquanto a adição de triptona (1%) aumenta quase 50 vezes o número de colônias comparado à adição de 1% de ácido casamino ao meio sintético.

GURNEY & QUESNEL (1980) mostraram que a recuperação de esporos de *B. subtilis* inativados por calor seco (140-170°C) depende marcadamente da composição do meio de cultura. No geral, meios mais complexos são mais eficientes do que meios menos complexos, que por sua vez são mais bem sucedidos do que meio sintético contendo L-alanina, ácido L-aspartico, L-metionina e glicina.

FUTTER & RICHARDSON (1970a) mostraram que a recuperação de esporos de *C. perfringens* tem um pH ótimo no intervalo de 7,0-7,8 após tratamento por óxido de etileno, 7,6-7,8 após irradiação gama e pH 8 após exposição ao calor úmido (34°C). O potencial de óxido-redução do ambiente afeta a recuperação dos esporos danificados. FUTTER & RICHARDSON (1970b) mostraram que sobreviventes dos esporos expostos ao óxido de etileno e radiação gama foram progressivamente diminuídos ao aumento na taxa de H₂:N₂ da atmosfera de recuperação.

Como exposto, condições de recuperação afetam a resistência dos microrganismos, sendo que até o mesmo meio de cultura, porém de fabricantes diferentes podem fornecer valores de resistência diferentes (BORIS & GRAHAM, 1985). Para minimizar estas variabilidades, REICH (1980a) sugere diversas condições específicas para o desenvolvimento do sistema de recuperação dos Indicadores Biológicos de *Bacillus subtilis* e interpretação dos dados, como:

- os suportes de Indicadores Biológicos processados devem ser transferidos ao meio de cultura o mais rápido possível, pois há um decréscimo significativamente rápido nos organismos recuperáveis nos 30 minutos iniciais após o ciclo de esterilização.
- tempo de incubação deve ser suficiente para garantir a recuperação de todos os organismos injuriados. É recomendado o tempo de 5 dias em caldo de soja caseína, a 32-37°C, pois uma consequência do esporo injuriado pelo óxido de etileno é a demora no crescimento do esporo, necessitando tempos de incubação mais longos do que o requerido para controles de população.

- residual de óxido de etileno no Indicador Biológico parece estar ligado ou concentrado no micro-ambiente dos esporos e/ou meio de inoculação.

2.2.4.3. Avaliação da Resistência do Indicador Biológico

Para investigar a probabilidade de sucesso de qualquer procedimento de esterilização, há necessidade de medir a resistência dos microrganismos. Teste de performance e resistência de Indicadores Biológicos deve incluir determinação do valor D, definido como o tempo (ou dose) de exposição ao agente esterilizante, sob condições específicas, necessário para reduzir a população de microrganismos em 90 % ou reduzir a população na ordem de 1 escala logarítmica.

Dois planos experimentais básicos são usados para estudos de cinética e esterilização bacteriana (AAMI, 1991c): o método de enumeração direta e o método de resposta quantal, referido às vezes como método NMP (número mais provável) ou fração de negativos.

O método de enumeração direta avalia a quantidade de microrganismos remanescentes na amostra tratada. A análise do número de sobreviventes usa a técnica padrão de plaqueamento padrão a tempos fracionados do processo de esterilização. Desta forma, o grau de letalidade, como função dos parâmetros de processo proposto, pode ser usado para desenvolver curva de morte. Este método é mais frequentemente usado durante o desenvolvimento do ciclo, mas pode ser usado para validação de processo.

O método de resposta quantal utiliza a proporção do número de replicatas não-estéreis no total de replicatas expostas a doses ou tempos selecionados de contato com o bactericida. Ou seja, o Indicador Biológico é inoculado em meio de cultura líquido e avaliado para resposta crescimento/não crescimento (não estéril/estéril). Esta metodologia é frequentemente usada para

monitoração de rotina ou para validação de processo, mas pode ser usado para desenvolvimento de processo.

Os dois experimentos são diferentes e os métodos de análise devem diferir (HAICHIGIAN & SCHLESINGER, 1991). O valor D obtido pelos dois métodos podem variar significativamente, pois cada um avalia uma área da curva de morte (vide figura 5), há diferenças na probabilidade de recuperação e diferenças podem ser devido ao desenho físico do indicador.

A estimativa de D usando o experimento de enumeração direta é dada por:

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t}, \text{ onde: } (1)$$

t = tempo de exposição

N₀ = número inicial de organismos antes do experimento ser conduzido

N_t = número total de organismos no tempo t

Dois métodos, preconizados pela AAMI (1991b) são utilizados para analisar os dados de resposta quantal: **Stumbo, Murphy & Cochran** (proposto por STUMBO, 1948 e STUMBO et alii, 1950) e **Spearman-Kärber** (bem esclarecido por PFLUG, 1990).

O procedimento de **Stumbo, Murphy & Cochran** define o valor D como:

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_U}, \text{ onde: } (2)$$

t = tempo de exposição

N₀ = número inicial de organismos por replicata

N_U = ln (n/r) - NMP estimado

n = número total de replicatas no tempo t

r = número de unidades negativas de crescimento no tempo t

O número de microrganismos sobreviventes (N_U), no tempo U é calculado dos dados quantais usando o método de HALVORSON & ZIEGLER (1933).

O procedimento de Spearman-Kärber usa um ponto específico no intervalo quantal, como mostra a figura 5, definido como tempo estimado de Spearman-Kärber (U_{SK}). Este é um método de estimativa do tempo de aquecimento que se espera observar antes de uma amostra com N_0 organismos tornar-se estéril. O U_{SK} é o tempo esperado ou tempo médio para esterilidade dos Indicadores Biológicos e pode ser calculado dos dados de fração de negativos. Este procedimento só pode ser usado se tempos de exposição sucessivos ao agente esterilizante diferem por um intervalo de tempo constante e o mesmo número de replicatas são expostas a cada intervalo.

A equação para calcular o tempo estimado de Spearman-Kärber é dada por:

$$U_{sk} = \sum_{i=1}^{k-1} \left[\frac{U_{i+1} + U_i}{2} \right] \left[\frac{r_{i+1}}{n_{i+1}} - \frac{r_i}{n_i} \right], \text{ onde}$$

U_{sk} = tempo estimado de Spearman-Kärber
 k^{sk} = primeiro tempo com todas as unidades negativas
 U_i = tempo i de tratamento
 r_i = nº de replicatas estéreis no tempo i
 n_i = nº de replicatas usadas no tempo i

Quando os tempos de exposição ao agente esterilizante diferem de uma constante de tempo (d) e o número de replicatas usadas (n) é constante em todos os tempos, a equação acima pode ser simplificada para:

$$U_{sk} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \cdot \sum_{i=1}^{k-1} r_i, \text{ onde:}$$

U_k = primeiro tempo de aquecimento com todas unidades negativas
 i = tempo de exposição
 r_i = número de replicatas estéreis no tempo i
 n = número de replicatas usadas no tempo i
 d = intervalo de tempo, em minutos, entre os tempos de exposição
 r_i = soma de replicatas estéreis (r) a todos os tempos de exposição entre U_1 e U_{k-1}

O valor D pode ser calculado por este procedimento, usando a seguinte equação:

$$D = \frac{U_{sk}}{(\log N_0 + 0,2507)} \quad , \text{ onde: } \quad (3)$$

N_0 = contagem média de esporos por IB determinada por contagem total de viáveis (carga microbiana inicial)

A variância de U_{sk} para dados onde o intervalo dos tempos de exposição ao agente esterilizante é constante e onde há o mesmo número de replicatas a cada tempo de aquecimento pode ser aproximada usando a seguinte equação (USP XXII, 1990; PFLUG, 1990):

$$V_{Usk} = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \cdot \sum_{U_1}^{U_{k-1}} r_i (n - r_i) , \text{ onde:}$$

V_{Usk} = variância de U_{sk}
 n = nº de replicatas usadas
 r = nº de replicatas estéreis
 d = intervalo de tempo, em minutos, entre os tempos de exposição

O desvio-padrão (DP) : $DP = \sqrt{V_{Usk}}$

Os limites superior e inferior do intervalo de confiança de 95% é dado por:

$$U_{sk} \pm 2DP$$

Para o valor D , o intervalo de confiança é dado por:

$$D = \frac{U_{sk} \pm 2DP}{\log N_0 + 0,2507} ,$$

sendo que a variabilidade aceitável do valor D descrita pela USP XXII (1990) é de $\pm 20\%$, apesar de OXBORROW et alii (1990) mostrarem que esta variabilidade é difícil de ser observada rotineiramente.

HACHIGIAN & SCHLESINGER (1991) mostram que o método de Stumbo, Murphy & Cochran, descrito acima (equação 2), subestima o valor D e propõe o uso do valor D_H (baseado no modelo de Epstein-Hachigian), sendo:

$$D_H = \frac{-2,3026 \cdot t}{\ln (-L^{-1} \ln (K/N)) } , \text{ onde: (4)}$$

L = número inicial de organismos por replicata
 K = número de replicatas estéreis
 N = número total de replicatas
 t = tempo de exposição

O uso prático do valor D como calculado em (4) é o mesmo daquele calculado em (1), sendo que erros devido a estimativa de NMP não influenciarão o cálculo de D. Assim, comparações entre laboratórios serão mais simples usando experimentos de resposta quantal do que usando experimentos de enumeração direta.

A Farmacopéia americana (USP XXII, 1990) recomenda a utilização do método de Spearman-Kärber, na avaliação dos Indicadores Biológicos para esterilização por óxido de etileno.

Conhecendo-se o valor D, define-se o tempo de exposição considerando a carga inicial dos Indicadores Biológicos e o fator de segurança de esterilidade. O método de teste de processo

reduzido é recomendado para Indicadores Biológicos e para processos de esterilização onde um único atributo pode ser avaliado, sendo útil na esterilização por óxido de etileno (AAMI, 1991c). Este método consiste em conhecer a carga microbiana inicial do Indicador Biológico e submeter o produto em sua configuração de carga normal no esterilizador a diversos ciclos diferentes para obter no mínimo um resultado com fração de negativos, sendo que este tempo de processo pode ser expresso como um determinado número de organismos sobreviventes (que poderá ser um ponto da resposta quantal). Uma linha pode ser extrapolada pelos 2 pontos (carga inicial e fração de negativos) até o fator de segurança de 10^{-6} e então o tempo de processo definido (figura 6). Nesta figura entende-se por P_{NSU} , a probabilidade de uma unidade não estéril e por U_R , o tempo de tratamento.

Figura 5: Áreas na Curva de Morte Analisadas pelos Diferentes Métodos de Determinação de D (AAMI, 1991c)

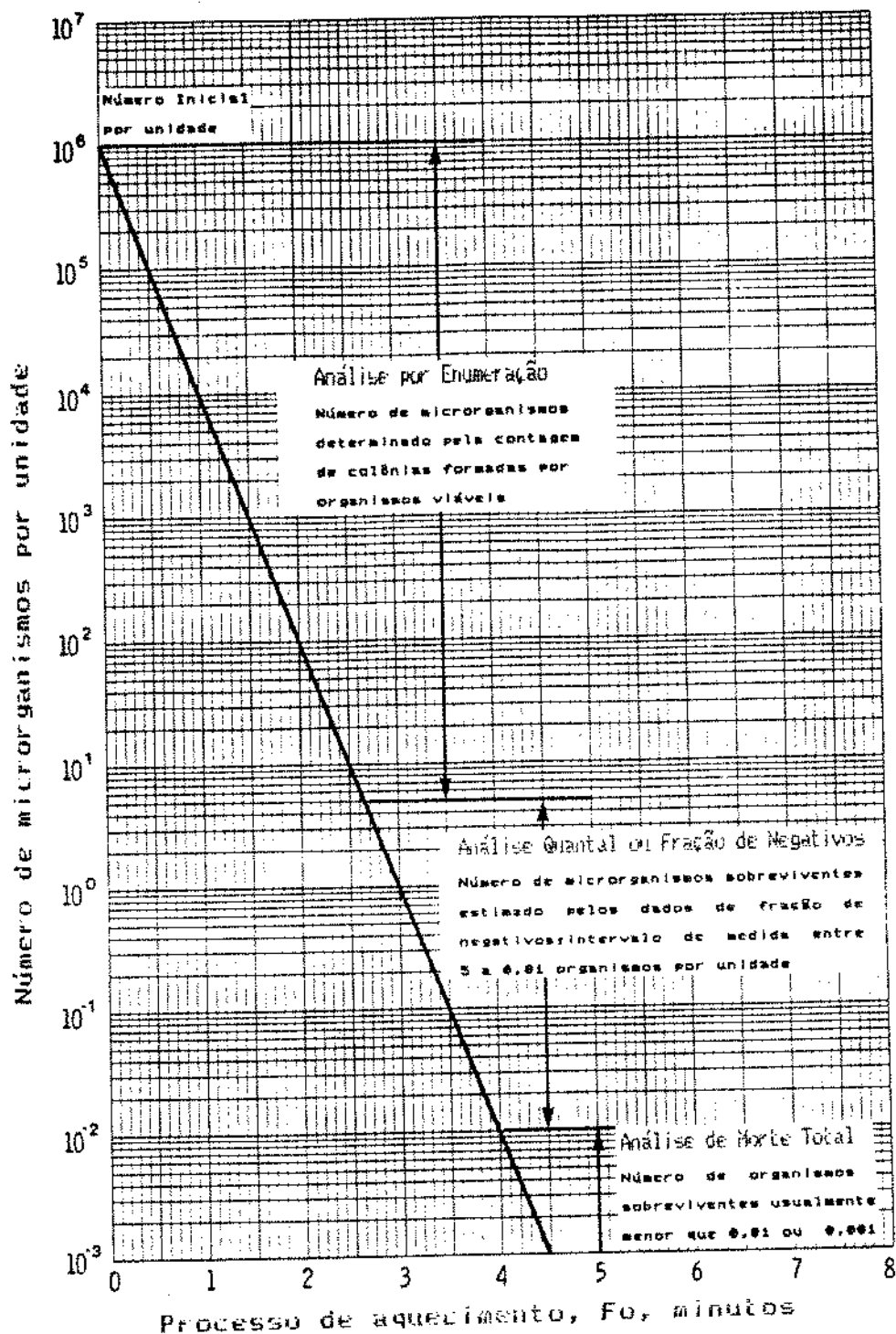
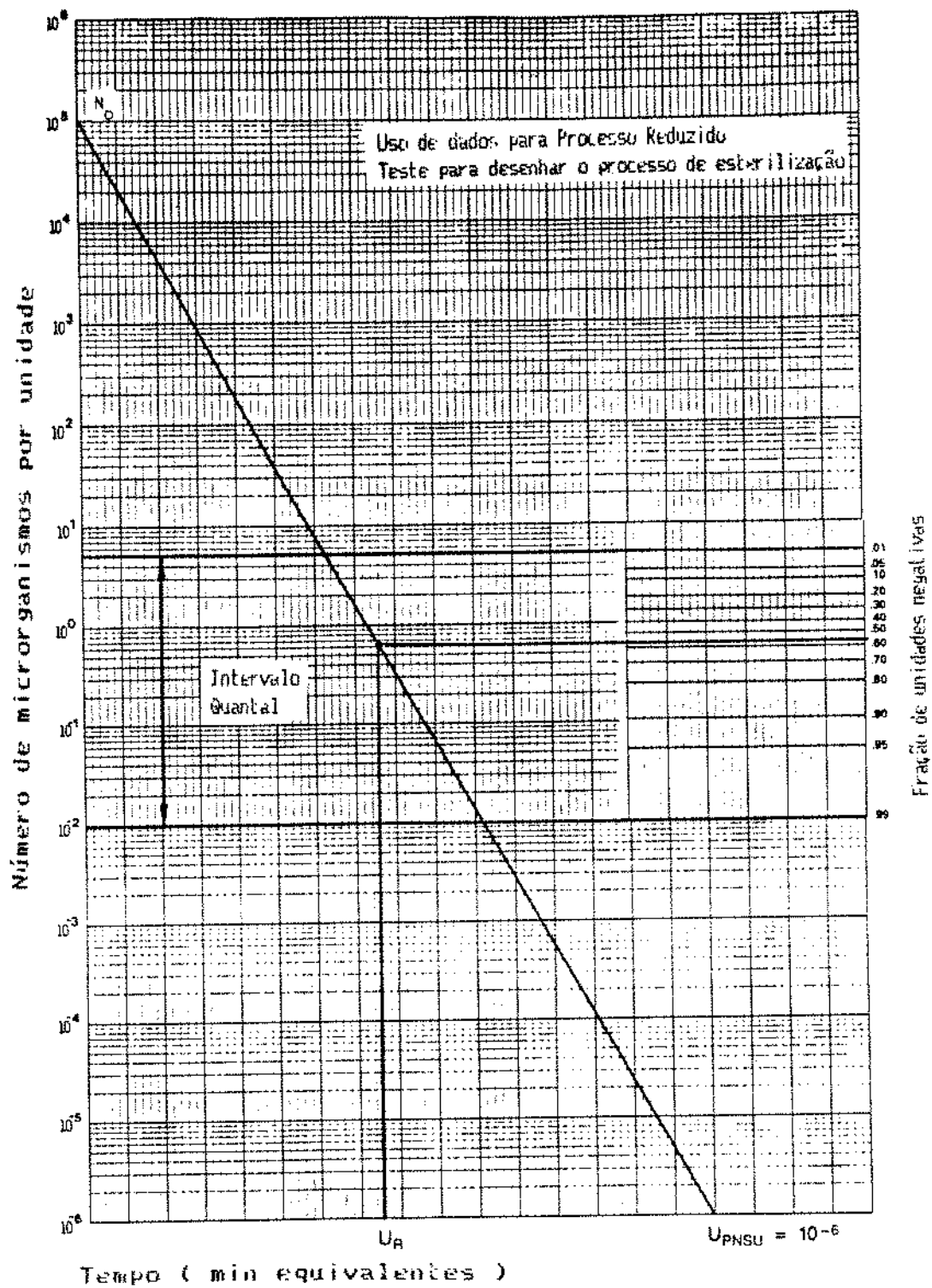


Figura 6: Desenho do Processo de Esterilização usando Teste de Processo Reduzido (AAMI, 1991c)



2.2.4.4. Padrões e Requerimentos no Uso de Indicador Biológico

Na Europa, a Farmacopéia Européia pode ser considerada como documento referência. A norma sobre esterilização do EUCOMED representa a visão da indústria dos padrões aceitáveis para a Europa no uso de Indicadores Biológicos. REINIKAINEN (1986) resume os modelos europeus, sendo que as duas normas (Farmacopéia Européia e EUCOMED) são similares em termos de filosofia geral. Os dois documentos definem um fator de segurança de 10^{-6} ; concordam que o uso de Indicador Biológico (*B. subtilis*) é essencial para provar a eficácia dos processos de esterilização por óxido de etileno; concordam com as características gerais dos Indicadores Biológicos em relação a como devem ser qualificados, isto é, reconhecimento do microrganismo, número de UFC, valor D e data de validade; concordam com as especificações básicas para Indicadores Biológicos como alta resistência, não patogeneicidade e a facilidade de cultura, sendo que o EUCOMED acrescenta facilidade no reconhecimento, viabilidade estável e valor D reprodutível. A maior diferença entre as duas normas está na insistência da Farmacopéia Européia de que os Indicadores Biológicos para a esterilização por óxido de etileno devem ser desumidificados.

Nos Estados Unidos há várias normas técnico-diretivas emitidas por diferentes entidades. As normas emitidas pela AAMI normalmente são aceitas pela indústria e comunidade reguladora, uma vez que os comitês desta associação são representados igualmente pela indústria, universidade, hospitais e órgãos reguladores.

Os tipos de Indicadores Biológicos aceitos pela AAMI (1991c) são:

- a. suporte inoculado: carregador contendo esporos envolvidos por embalagem de papel ("glassine"). Vários tipos de suporte são estudados (como papel, vidro, tecido,

alumínio), porém o suporte indicado pela AAMI é papel. Não há meio de recuperação incluído nesta unidade. Este tipo de Indicador Biológico requer técnicas assépticas de cultura e pode ser usado para análise de enumeração direta ou resposta quantal

b. portador: meio de recuperação faz parte da unidade. Há 2 tipos:

- o suporte contendo os esporos não está em contato direto com o meio de recuperação. A unidade deve ser ativada após processamento (usado para vapor d'água e gás).
- esporos misturados com meio de cultura em uma ampola selada de vidro (usado apenas para esterilização à vapor d'água). Não é usado para análise de enumeração direta, mas disponível para validação ou monitoração de rotina.

c. produto inoculado: a suspensão de esporos é inoculada diretamente no produto (em alimentos é conhecida como técnica de embalagem inoculada). Este tipo de inoculação pode causar sobrevivência prolongada dos esporos. Pode ser usado em análises de enumeração direta ou resposta quantal. Requer técnicas assépticas de cultura e normalmente é usado em desenvolvimento de ciclo.

A AAMI orienta que os testes para verificar performance de Indicador Biológico sejam conduzidos em uma câmara teste que reproduza os requisitos de performance dados pela norma da câmara BIER. Câmaras tipo BIER são críticas na avaliação de performance de Indicadores Biológicos, pois elas permitem a rápida chegada e fim das condições de exposição de forma precisa e acurada, o que é bastante importante nas avaliações de óxido de etileno, pois não há modelos matemáticos que calculem a letalidade da "subida" e "descida" do ciclo de exposição (AAMI, 1992a). Além disto, o desenho da câmara BIER é feito de forma a prover condições de

esterilização reprodutíveis dentro de parâmetros definidos e controlados.

A AAMI (1992a) endossa os requisitos da Farmacopéia americana (USP XXII, 1990) que requer as seguintes características do equipamento usado nos testes de performance de Indicador Biológico utilizado na esterilização por óxido de etileno:

- . tempo para alcançar a concentração de gás especificada e tempo de exaustão menor que 1 minuto
- . quantidade de gás admitida de forma a se obter $\pm 5\%$ da concentração de gás definida
- . controles de umidade capazes de manter a umidade relativa da câmara dentro de 10% da umidade relativa definida ($\pm 5\%$).
- . controles de temperatura capazes de manter um intervalo de temperatura na câmara de $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- . medidores de pressão com precisão de $\pm 6,35$ mmHg

Usando os requisitos de equipamentos e procedimentos de testes descritos pela USP XXII (1990), o Indicador Biológico para esterilização por óxido de etileno é considerado padronizado quando atende a seguinte performance (USP XXII, 1990; AAMI, 1991c):

$$\begin{aligned} D &= 2,6 - 5,8 \text{ min} \\ &\text{ou} \\ \text{tempo de sobrevivência} &= 10,4 - 23,2 \text{ min} \\ \text{tempo de morte} &= 26,0 - 58,0 \text{ min,} \end{aligned}$$

sendo que a avaliação deve ser feita nas seguintes condições de processo (normalmente realizada na câmara BIER):

$$\begin{aligned} \text{concentração de EO} &= 600 \pm 30 \text{ mg/l} \\ \text{temperatura} &= 54 \pm 1^{\circ}\text{C} \\ \text{umidade relativa} &= 60 \pm 10\% \end{aligned}$$

O valor D é calculado usando o procedimento de Spearman-Kärber, com grupos de 10 Indicadores Biológicos. Por opção de avaliação do

tempo de morte/sobrevivência, a USP XXII (1990) indica o uso de 2 grupos de 20 IBs.

De acordo com AAMI (1986), a performance do Indicador Biológico para processos de esterilização em instalações de cuidados à saúde deve ser dada por:

tempo de sobrevivência = não menor que 15 min
tempo de morte = não maior que 60 min

2.2.5. Equipamento de Esterilização por Óxido de Etileno

Esterilizadores por óxido de etileno são utilizados para esterilizar uma série de produtos e materiais, sendo que muitos destes são destinados ao uso em procedimentos cirúrgicos. Assim, uma falha ou performance inadequada do esterilizador pode resultar em sérias conseqüências, como infecções, que podem colocar em risco a vida dos pacientes. Além disto, esterilizadores por óxido de etileno e fontes do agente esterilizante representam riscos potenciais à segurança dos operadores do esterilizador e das pessoas que manipulam e utilizam os produtos esterilizados por óxido de etileno, representado pela exposição potencial ao gás e ao residual de óxido de etileno presente nos produtos esterilizados (AAMI, 1987).

Baseado nestas premissas, são definidas 3 áreas importantes a serem avaliadas no uso da esterilização por óxido de etileno: a necessidade de garantir a segurança dos operadores dos esterilizadores e demais trabalhadores que manipulam e utilizam os produtos esterilizados por óxido de etileno, a necessidade de medir e controlar adequadamente os parâmetros de esterilização e a necessidade da validação da performance do esterilizador e parâmetros dos ciclos de esterilização (AAMI, 1987a).

O esterilizador por óxido de etileno é constituído basicamente por um vaso de pressão com capacidade para evacuar ar, aquecer e umidificar o produto uniformemente, adicionar gás à temperatura

específica e remover o gás após um intervalo de tempo determinado. Poucas alterações têm-se observado nestes últimos 20 anos nos equipamentos e os maiores progressos estão relacionados com instrumentação e controle computadorizado dos esterilizadores e ciclos. A introdução de programas computadorizados nos sistemas de esterilização traduz em ciclos mais complexos e eficientes (CAPUTO & ODLAUG, 1983).

Para realização de um processo seguro e efetivo, os componentes principais do esterilizador devem ser desenhados de modo a oferecer o menor risco possível de vazamento (GILLIS & BRUCH, 1983). O material de construção deve ser resistente à corrosão. Os instrumentos devem permitir uma leitura consistente com os requisitos do processo, acompanhando um programa de manutenção preventiva e aferição dos instrumentos (no mínimo uma vez por ano).

O ciclo clássico de esterilização por óxido de etileno é formado por 5 estágios: pré-condicionamento e umidificação, injeção de gás, período de exposição, evacuação e aeração.

O sistema de controle mais simples para assegurar a concentração do gás adicionado no processo é a pesagem dos cilindros logo após a entrada de gás nas câmaras ou através do cálculo teórico da concentração de óxido de etileno no esterilizador, baseado na Lei dos Gases Ideais ($PV = nRT$), com as seguintes suposições (AAMI, 1987a, 1988a):

- a mistura de óxido de etileno, vapor d'água e ar (e gás diluente quando usado) comporta-se como um gás ideal.
- não há perda seletiva de um componente da mistura (isto é, por absorção ou adsorção).
- a informação dos cilindros contendo o gás é precisa, e a porcentagem do peso da mistura de gás permanece constante quando introduzido no esterilizador.
- a pressão é definida em termos absolutos ou diferenças nas

leituras do indicador, preferencialmente à pressão do indicador (diferença da pressão atmosférica).

Baseado nestas suposições, a concentração de óxido de etileno é calculada com base na diferença da pressão total, resultada da adição de óxido de etileno (EO) e do gás diluente (DG), e da temperatura do esterilizador, sendo expressa por:

$$P = P_{EO} + P_{DG} = [(n/V)_{EO} + (n/V)_{DG}].RT, \text{ onde:}$$

P = pressão
P_{EO} = pressão parcial de óxido de etileno
P_{DG} = pressão parcial do gás diluente
n = n° de moles
V = volume
R = constante dos gases
T = temperatura

Rearranjando a equação acima (Lei dos Gases Ideais), o cálculo da concentração de óxido de etileno é dado por:

$$C = (K.P)/(R.T) = [(4,4.10^4 ME)/(ME + 44 (100 - E))].P/RT$$

onde:

C = concentração de EO (mg/l)
K = constante para o gás diluente (dado na tabela 5)
P = diferença na pressão total devido ao EO e gás diluente
R = constante dos gases
T = temperatura absoluta da mistura do gás EO/diluente dado a pressão P
M = peso molecular do gás diluente
E = porcentagem de peso do EO na mistura diluente

A tabela 6 lista algumas constantes de gás para várias pressões e unidades de volume.

Tabela 5: Constantes e Pesos Moleculares para Misturas EO/Diluyente (AAMI, 1987a)

MISTURAS		
EO/Diluyente	K(mg/gm mole)*	K (lb/lb mole)**
10%EO/90%Diluyente	$4,40 \times 10^3$	4,40
12%EO/88%CCl ₂ F ₂	$1,20 \times 10^4$	$1,20 \times 10^1$
20%EO/80%CO ₂	$8,80 \times 10^3$	8,80
100%EO	$4,40 \times 10^4$	$4,40 \times 10^1$
Pesos moleculares: Óxido de Etileno (EO)		
		44,0
Diclorofluormetano (CCl ₂ F ₂)		
		120,9
Dióxido de carbono (CO ₂)		
		44,0

* usar quando a concentração de gás vai ser expressa em mg/l
 ** usar quando a concentração de gás vai ser expressa em lb/pé³

Tabela 6: Constantes dos Gases - $R = PV/nT$ (AAMI, 1987a)

Pressão	Volume	Moles	Temperatura	Constante do Gás(R)
atm	cc	gm	K	82,057
atm	l	gm	K	0,08205
atm	pé ³	lb	K	1,3140
bar	l	gm	K	0,08314
kg/m ²	l	gm	K	847,80
kg/cm ²	l	gm	K	0,08478
mmHg	l	gm	K	62,361
mmHg	pé ³	lb	K	998,90
polHG	l	gm	K	2,4549
lb/pol ²	pé ³	lb	R	10,73

Os monitores de pressão devem ter acuidade de +- 2,5% da escala completa de calibração (AAMI, 1987a).

A umidade na câmara é obtida normalmente da injeção de vapor d'água durante o processo. Da pressão parcial devido o vapor d'água e temperatura da câmara, a umidade relativa dentro de uma câmara de óxido de etileno pode ser calculado como (AAMI, 1987a):

$$\%UR = 100.Pv/Pg, \quad \text{onde:}$$

Pv = pressão parcial devido ao vapor d'água

Pg = pressão de saturação do vapor d'água à temperatura de esterilização.

A pressão de saturação do vapor d'água a diversas temperaturas:

T (°F)	Pg
100	0,9492
110	1,2748
120	1,6924
130	2,2225

O controle de temperatura deve representar a temperatura do interior da câmara e a diferença máxima recomendada entre dois pontos no seu interior deve ser menor ou igual a $\pm 3^{\circ}\text{C}$. Os monitores de temperatura devem possuir acuidade de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ na temperatura de exposição (AAMI, 1987a). Aquecimento de gás durante sua injeção no esterilizador dificulta a estratificação do gás na câmara e possíveis danos causados aos produtos. Aconselha-se a instalação de um registrador de temperatura com um mínimo de três termopares, para autoclaves com volume de até $2,8\text{m}^3$. A transferência de calor e o controle de temperatura não devem permitir variações de temperatura na carga de produtos, isto é, não deverá haver pontos excessivamente frios ou quentes que possam comprometer a esterilidade ou funcionalidade dos produtos. O registro de tempo de exposição e temperatura podem ser realizados pelo mesmo equipamento registrador.

A quebra de vácuo e aeração dos produtos nas câmaras é feita através de injeção de ar ou outro gás inerte. Quando as embalagens e os seus sistemas de fechamento não permitirem uma barreira eficaz aos microrganismos, filtros bacteriológicos ($0,45 \mu\text{m}$) devem ser instalados para filtração do ar ou gás.

Os equipamentos devem possuir ainda um sistema eficiente de aeração para remoção dos resíduos após o processo. O equipamento deverá permitir o maior número de trocas de ar possível no seu interior, sem causar danos à embalagem. A aeração na própria autoclave é preferível aos aeradores independentes, devido ao risco de exposição dos operadores durante a transferência dos produtos. LYON (1988) introduz um método matemático capaz de comparar os ciclos de lavagem de óxido de etileno e estimar o efeito de alterações nos parâmetros de ciclos na remoção do residual do gás. A instalação de sistemas de exaustão sobre as portas é uma das maneiras de se evitar a propagação dos gases para o ambiente de trabalho durante a abertura das câmaras.

A descarga do gás é um dos pontos que mais contribuem para a contaminação dos ambientes de trabalho. A maneira mais eficiente é a descarga em água a pH entre 2 e 3. A descarga na atmosfera deve ser cuidadosamente avaliada para se evitar a contaminação de pessoas em outros ambientes de trabalho ou de edifícios e casas próximas.

A estocagem dos cilindros, mesmo aqueles em uso nas autoclaves, deve ser realizada em ambiente externo, com perfeita ventilação, em área de acesso restrito, contendo placas de identificação do gás e recomendações para procedimentos de emergência.

Alguns requisitos são requeridos do fabricante na aquisição de esterilizadores por óxido de etileno: ser adequadamente identificado (nome do fabricante, modelo, nº de série, requisitos elétricos) e deve estar disponível para uso, um manual contendo informações como (AAMI, 1987a):

- . instruções para instalação
- . instruções para operação segura e efetiva
- . tipo de esterilizante/diluente usado, procedimentos de instalação, estocagem e uso

- . especificações técnicas (requisitos de pressão, temperatura, material, componentes elétricos, filtros de ar, etc)
- . recomendações de segurança na operação
- . instruções para inspeção e manutenção rotineira

2.3. Validação de Indicador Biológico e do Processo de Esterilização por Óxido de Etileno

Validação é um termo que descreve um programa desenvolvido para assegurar a reprodutibilidade do processo , garantindo que os resultados serão sempre satisfatórios e de acordo com a segurança exigida para os produtos processados.

A validação do processo de esterilização é uma evidência documentada que indica, com alto grau de segurança, que um processo específico produzirá consistentemente um produto com características de qualidade dentro de requisitos pré-determinados (AAMI, 1988a).

Após definição do produto e desenvolvimento do processo, um programa de validação deve ser conduzido para demonstrar que o processo pode esterilizar o produto especificado.

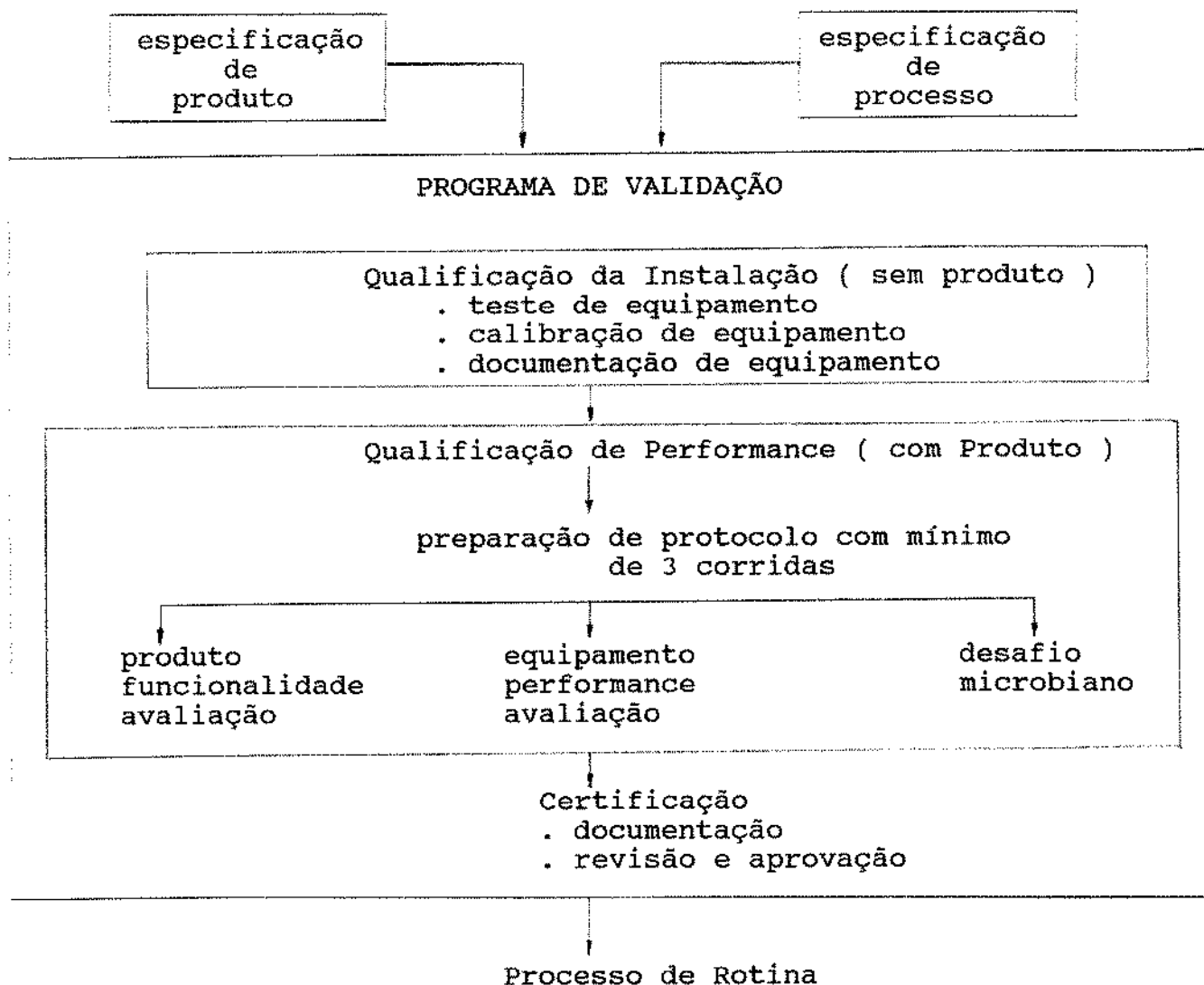
Tal programa pode ser resumido em 3 etapas básicas (AAMI, 1988a):

1. Qualificação das Instalações: o objetivo é estabelecer que equipamento, controles e instrumentos têm capacidade de operar dentro dos parâmetros requeridos. Assim, procedimentos devem ser realizados para assegurar que todos os equipamentos e sistemas de suporte estão funcionando adequadamente. Ou seja, todos os instrumentos devem ser aferidos e o equipamento calibrado para garantir confiabilidade e reprodutibilidade.

2. Qualificação da performance do processo: realização do processo de esterilização com tempos fracionados (mantendo os demais parâmetros), a fim de avaliar a letalidade do processo através da curva de morte de Indicador Biológico e de Produtos, determinando assim, o processo de esterilização para fator de segurança definido.

3. Certificação: registro e análise de todos os dados das etapas anteriores. Revisão e aprovação da documentação deve ser realizada para definir as condições mínimas de processo.

Todo este processo pode ser esquematizado da seguinte forma (AAMI, 1987a):



Revalidação periódica (tipicamente conduzida anualmente) deve ser realizada para assegurar o fator de segurança (AAMI, 1988a, 1991c). Entretanto, o programa de revalidação não deve necessariamente ser um programa tão extenso (USP XXII, 1990).

Uma vez que o Indicador Biológico é item usado na validação de processo de esterilização, este deve ser previamente padronizado e validado, especialmente aqueles usados na esterilização por óxido de etileno, que em função do grande número de variáveis que influenciam a eficácia do processo, requer monitoração constante.

De acordo com CAPUTO & MASCOLI (1980), o desenho do Indicador Biológico para monitorar a eficácia de um processo de esterilização pode ser dividido em 4 etapas:

- . Seleção e produção do microrganismo indicador: microrganismo é selecionado para uso e procedimentos de propagação são desenvolvidos para garantir produção consistente de população homogênea de esporos com definida resistência ao agente esterilizante

- . Resistência do microrganismo: valor D deve ser determinado em equipamentos capazes de reproduzir precisamente os parâmetros de esterilização

- . Performance do Indicador Biológico: deve ser avaliado no esterilizador de produção (a ser validado) com carga de rotina (ou simulada). Isto porque condições de esterilização (isto é, concentração de gás, umidade, temperatura, etc) são afetadas pela densidade da carga.

- . Determinação do nível de microrganismo a ser usado como Indicador Biológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Organismos

Neste experimento foram utilizados esporos de *B. subtilis* var. *niger* (*globigii*) ATCC 9372 (CHRISTENSEN & KRISTENSEN, 1979; REICH, 1980a; AAMI, 1986) provenientes de 2 fontes:

1. esporos de Indicador Biológico tipo fita carregadora de papel do fornecedor AMSCO, lote GL 121 D
2. esporos provenientes de cultura liofilizada da Coleção de Culturas DSM, identificada como DSM 675.

A partir destes esporos foram produzidos inicialmente 2 Indicadores Biológicos, cuja performance foi comparada ao IB AMSCO, considerado IB referência neste estudo.

3.2. Preparo da Suspensão de Esporos

3.2.1. Preparo da Suspensão Estoque

Suspensão aquosa de esporos foi preparada de acordo com o método de DADD & DALEY (1980), com algumas particularidades baseadas em avaliações não publicadas de eficácia do procedimento (acompanhamento e avaliação da carga microbiana - vide item 3.4.3 e resistência dos Indicadores Biológicos de acordo com requisitos da USP XXII, 1990 e AAMI, 1986).

O preparo da suspensão de esporos segue as seguintes etapas:

Os esporos bacterianos de *B. subtilis* var. *niger* (*globigii*) foram recuperados em TSB, utilizando tubos com 40 ml de meio, que foram incubados à 30-35°C por 24 h. Os microrganismos foram transferidos para placas de petri contendo TSA, onde permaneceram por 72 h.

Uma colônia isolada foi transferida para tubos contendo 200 ml de TSB , que foram incubados à 30-35°C por 24h. Avaliação morfológica e bioquímica foram realizadas (procedimentos de teste descritos por SNEATH et alii, 1986, e características microbiológicas dadas por GORDON et alii, 1973).

Uma vez obedecidos os requisitos, 3 ml da solução do tubo de TSB foi transferido para garrafa de esporulação contendo 250 ml de Agar Nutriente. Após 15 minutos, o excesso do líquido foi removido e a garrafa armazenada em posição invertida à 30-35°C por 6 a 7 dias, de tal forma a obter 90% de esporulação. Coloração de Verde Malaquita foi realizada para confirmar esta porcentagem (FIELDS, 1975).

Os esporos da garrafa foram removidos utilizando 20 ml de água destilada auxiliado por aproximadamente 20 pérolas de vidro e fazendo movimentos circulares. O líquido foi centrifugado por 1 h a 5.000 rpm. O sobrenadante foi retirado. 15 ml de água destilada foi acrescentada ao precipitado e novamente centrifugado por 1 h a 5.000 rpm. Esta lavagem foi repetida mais 3 vezes.

30 ml de água destilada foi acrescentada ao precipitado e armazenado em frasco âmbar com 30 pérolas de vidro sob refrigeração (5-7°C) até seu uso.

A concentração de esporos desta solução estoque foi avaliada de acordo com item 3.4.1.

3.2.2. Preparo da Suspensão Trabalho

À suspensão estoque foi acrescentado volume V de solução alcóolica de etanol 40% (GRAHAM, 1986), sendo $V = (b/a).c$, onde V= volume a ser transferido para a suspensão estoque, a= concentração de esporos na suspensão estoque, b= concentração desejada (10^7) e c= volume desejado de suspensão.

A solução trabalho foi mantida sob refrigeração ($5-7^{\circ}\text{C}$) até seu uso.

A concentração de esporos desta solução foi avaliada de acordo com item 3.4.2.

3.3. Preparo do Indicador Biológico Tipo Fita Carregadora

A suspensão trabalho foi agitada por 2 h em agitador magnético. 0,1 ml desta suspensão foi transferida para tira de papel ($350\text{g}/\text{cm}^2$ e $250\text{g}/\text{cm}^2$ na primeira e segunda fases do experimento) de $380 \times 70\text{mm}$, utilizando pipetador automático.

As tiras assim preparadas foram secas à Temperatura Ambiente por 24 h e posteriormente armazenados vide item 3.5.

A concentração de esporos da fita carregadora foi avaliada de acordo com item 3.4.3 e a mesma estava na ordem de 10^6 esporos/unidade. Após estabilização dos esporos (armazenados por no mínimo 1 mês), os esporos das fitas carregadoras foram recuperados e avaliados morfológica e bioquimicamente (SNEAT et alii, 1986) utilizando como referência as características do *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 dado por GORDON et alii (1973), descritas no item 2.2.4.1.

3.4. Avaliação da Concentração de Esporos

3.4.1. Suspensão Estoque

A suspensão estoque foi agitada à 320 rpm por 2 h. 1 ml da suspensão foi transferida para tubo contendo 9 ml de solução fisiológica e pérolas de vidro (diluição 10^{-1}). O tubo foi agitado por 1 min.

A suspensão foi aquecida à 80 °C por 20 min (para eliminar células vegetativas), transferida imediatamente para o gelo, onde permaneceu por 20 min. Após, a solução foi agitada por 2 min. e diluições sucessivas até 10^{-7} , $10^{-7/5}$ e $10^{-7/2}$ foram realizadas.

0,1 ml destas diluições foi transferido para placas contendo TSA (triplicata para cada diluição) e alça de Drigalski foi usada para espalhar a solução na placa. As placas foram incubadas à 30 - 35°C por 24-36 h. As contagens foram realizadas e a concentração de esporos calculada.

3.4.2. Suspensão Trabalho

A suspensão trabalho foi agitada à 320 rpm por 2 h e 1 ml foi transferida para tubo contendo 9 ml de solução fisiológica (diluição 10^{-1}). Diluições sucessivas até 10^{-5} , $10^{-4/5}$ e $10^{-4/2}$ foram realizadas.

0,1 ml destas diluições foi transferido para placas contendo TSA (triplicata para cada diluição). As placas foram incubadas à 30-35°C por 24-36 h. As contagens foram realizadas e a concentração de esporos calculada.

3.4.3. Indicador Biológico Tipo Fita Carregadora

1 fita carregadora contendo esporos de *B. subtilis* var. *niger* (*globigii*) foi picotada em erlenmeyer contendo 100 ml de salina com 0,01% de tween 80 e pérolas de vidro (diluição 10^{-2}). Esta solução foi agitada por 2 h à 320 rpm. Diluições sucessivas até $10^{-3/2}$ foram realizadas. 0,1 ml desta diluição foi transferido para placas contendo TSA (triplicata para cada diluição). As placas foram incubadas à 30-35°C por 24-36 h. As contagens foram realizadas e a concentração de esporos calculada.

5 fitas carregadoras foram avaliadas por lote.

3.5. Amostras

3.5.1. Avaliação da Performance dos Indicadores Biológicos X Condições de Armazenamento

Fitas carregadoras preparadas como descrito no item 3.3 foram armazenadas sob duas condições (Apêndices 3, 4 e 5):

1. sob refrigeração: temperatura ($5-7^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ambiente do refrigerador . Esta foi denominada condição 1.
2. sob refrigeração, com umidade relativ controlada: temperatura de $5-7^{\circ}\text{C}$, com 75,7% UR (obtida com armazenamento das fitas carregadoras em dessecador de vidro com solução aquosa saturada de NaCl - ASTM E 104). Esta foi denominada condição 2.

Para facilitar a identificação das amostras testadas, foi adotada a seguinte codificação:

IB-A1, IB-A2, IB-B1, IB-B2, IB-C1 e IB-C2, onde:

Indicador Biológico (ref: item 3.1):

A: Indicador Biológico produzido em nosso laboratório a partir de esporos do Indicador Biológico AMSCO, lote GL 121 D.

B: Indicador Biológico produzido em nosso laboratório a partir de esporos liofilizados da Coleção de Culturas DSM, identificação DSM 675.

C: Indicador Biológico AMSCO, lote GL 121 D.

Condições de Armazenamento: descrito acima

3.5.2. Avaliação da Influência do Tipo de Papel Suporte

Fitas carregadoras foram preparadas como descrito no item 3.3, porém usando 2 tipos de papel suporte (diferentes gramaturas):

1. polpa de madeira: 350g/cm^2

fabricante: Papel e Celulose Catarinense S. A.

2. papel filtro : 250g/cm^2

fabricante: Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S. A.

Os IBs foram produzidos a partir de esporos de IB AMSCO, lote GL 121 D. As fitas foram armazenadas em refrigerador (condição 1).

Para facilitar a identificação destas amostras, adotamos a seguinte codificação: D1 e D2, para os respectivos papéis descritos acima. Para acompanhar estes IBs, os ciclos foram monitorados também com IB AMSCO, lote GL 092 B (denominado IB D3).

3.5.3. Preparo de Amostras

Antes da exposição dos Indicadores Biológicos ao óxido de etileno, as amostras foram preparadas da seguinte maneira: a fita carregadora foi embalada em um suporte de papel de $0,6\text{g}$, que por sua vez foi colocado dentro de uma cavidade de embalagem aluminizada de 23×9 cm (embalagem com 6 cavidades) - 1 fita carregadora/cavidade. Por ser impermeável ao óxido de etileno esta embalagem possui uma abertura a fim de permitir a entrada de gás (Apêndices 1 e 2). Isto pois os produtos são esterilizados nesta embalagem.

3.6. Esterilizador

Os ciclos foram conduzidos em um esterilizador de laboratório de $0,5\text{ m}^3$, fabricante QUETZAL Eletrônica S.C.A. O esterilizador é do

tipo comum com jaqueta, de porta única com movimento vertical, o vaso interno de aço-inoxidável e pressão de projeto de 40 psig, com todos os componentes elétricos à prova de explosão ou protegidos por barreiras intrinsecamente seguras.

A entrada de nitrogênio e óxido de etileno é feita pela parte inferior da parede esquerda do esterilizador através de um tubo perfurado. O esterilizador dispõe de um sistema de circulação e homogeneização da mistura gasosa e de 6 termopares móveis, tipo K - cromel/alumel (Apêndice 6).

3.7. Ciclo de Esterilização

No ciclo experimental foi utilizada a mistura gasosa óxido de etileno+ nitrogênio (45%E0/55%N₂). O ciclo teve as seguintes etapas (figura 7):

1. Evacuação de ar: foi feito vácuo na câmara até 22,5 torr em até 30 minutos.
2. Umidificação: injetou-se vapor d'água até a pressão de 40-43 torr, temperatura máxima de 32°C, em até 30 minutos.
3. Adição de Gás: injetou-se nitrogênio até a pressão de 440 - 460 torr. Injetou-se óxido de etileno até 750-770 torr, mantendo a temperatura de 28-30°C.
4. Exposição ao Gás: manteve-se e monitorou-se as condições do esterilizador (pressão: 700-770 torr, temperatura: 28-30°C) pelo intervalo de tempo definido no experimento.
- 5 Evacuação de Gás: após o tempo de exposição, evacuou-se a câmara até 10 torr por 60 minutos. Injetou-se nitrogênio filtrado na câmara até 700 torr e aguardou-se por 15 minutos. Esta operação foi repetida mais 2 vezes.

A retirada de gás neste processo foi exigida para evitar a exposição do operador ao óxido de etileno. Isto porque usando tempo menor que o descrito, ao se abrir o esterilizador, o

monitorador (cromatógrafo gasoso) indica índices maiores que o permitido pela legislação.

3.8. Exposição dos Esporos ao Óxido de Etileno

3.8.1. Padronização dos Indicadores Biológicos

Em paralelo ao teste de performance utilizando a mistura EO/N₂, foi avaliada a resistência das amostras IB A, IB B e IB C, usando câmara tipo BIER para óxido de etileno, nas condições requeridas pela AAMI (1986, 1991c) e USP XXII (1990): 600+-30 mg/l de óxido de etileno, 54+-1°C e 50-70% UR. Esta avaliação foi realizada considerando tempo de morte/sobrevivência. Cabe salientar que estas condições são estabelecidas para padronização do IB, independente das condições de processo utilizadas nos demais esterilizadores.

3.8.2. Avaliação da Performance dos Indicadores Biológicos X Condições de Armazenamento (1ª Fase)

Esta parte do experimento foi realizada obedecendo o seguinte plano: 20 amostras de IB A1, IB A2, IB B1, IB B2, IB C1 e IB C2 (20 de cada), preparadas de acordo com item 3.5 foram expostas a ciclos fracionados de exposição ao óxido de etileno(tempos: 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 minutos de exposição, considerando tempos desde que todas amostras são não estéreis até tempo em que todas as amostras são estéreis). Cada ciclo foi realizado em triplicata.

20 replicatas de cada amostra foram avaliadas, pois é o mínimo requerido para métodos que utilizam os dados de fração de negativos - NMP (AAMI, 1991b) . Para cada ciclo foram testados 120 IBs no total.

O esterilizador foi preenchido com uma carga de 12.000 produtos-fantasia (suporte de papel de 0,6 g colocado em cada uma das 6

cavidades da embalagem aluminizada de 23X9 cm. Estas embalagens, por sua vez, foram colocadas na posição vertical, com aberturas viradas para cima, em bandeja de aço-inoxidável, perfurada e sem cobertura - 100 embalagens aluminizadas/bandeja, perfazendo o total de 20 bandejas) e as amostras teste foram colocados no Centro Geométrico do esterilizador (Apêndices 7 e 8). A carga só foi reutilizada após 48 h do ciclo de exposição ao óxido de etileno.

O teor de umidade das amostras descritas acima foi avaliado , através da pesagem das fitas carregadoras antes e após secagem em estufa à 120°C por 2 horas. O plano amostral para esta etapa do experimento foi: 15 fitas carregadoras de cada amostra (IB A1, IB A2, IB B1, IB B2, IB C1 e IB C2), dividida em 3 lotes de 5.

3.8.3. Avaliação da Influência do Tipo de Papel Suporte (2ª Fase)

Esta etapa do experimento foi realizada com 20 amostras de IB D1, IB D2 e IB D3, preparadas de acordo com item 3.5.2 expostas a ciclos fracionados de exposição ao óxido de etileno(tempos: 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 minutos de exposição). Para cada ciclo foram testados 60 IBs no total.

A carga do esterilizador foi preparada como descrito no item 3.8.2, assim como teste de umidade destes IBs foi realizado.

3.9. Teste de Esterilidade

Após a exposição dos Indicadores Biológicos à mistura EO/N₂, as embalagens que os abrigavam foram colocadas em saco plástico estéril (para evitar recontaminação), selado e enviado ao Laboratório de Microbiologia, onde foi realizado imediatamente teste de esterilidade através do método Direto, inoculando a amostra em meio de cultura - tubos contendo 40 ml de TSB (USP XXII, 1990; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Os tubos foram

incubados à 30-35°C por um período de 7 dias e as leituras foram realizadas no 3º e 7º dias. Os contaminantes dos tubos com crescimento foram identificados para confirmar a presença do *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*).

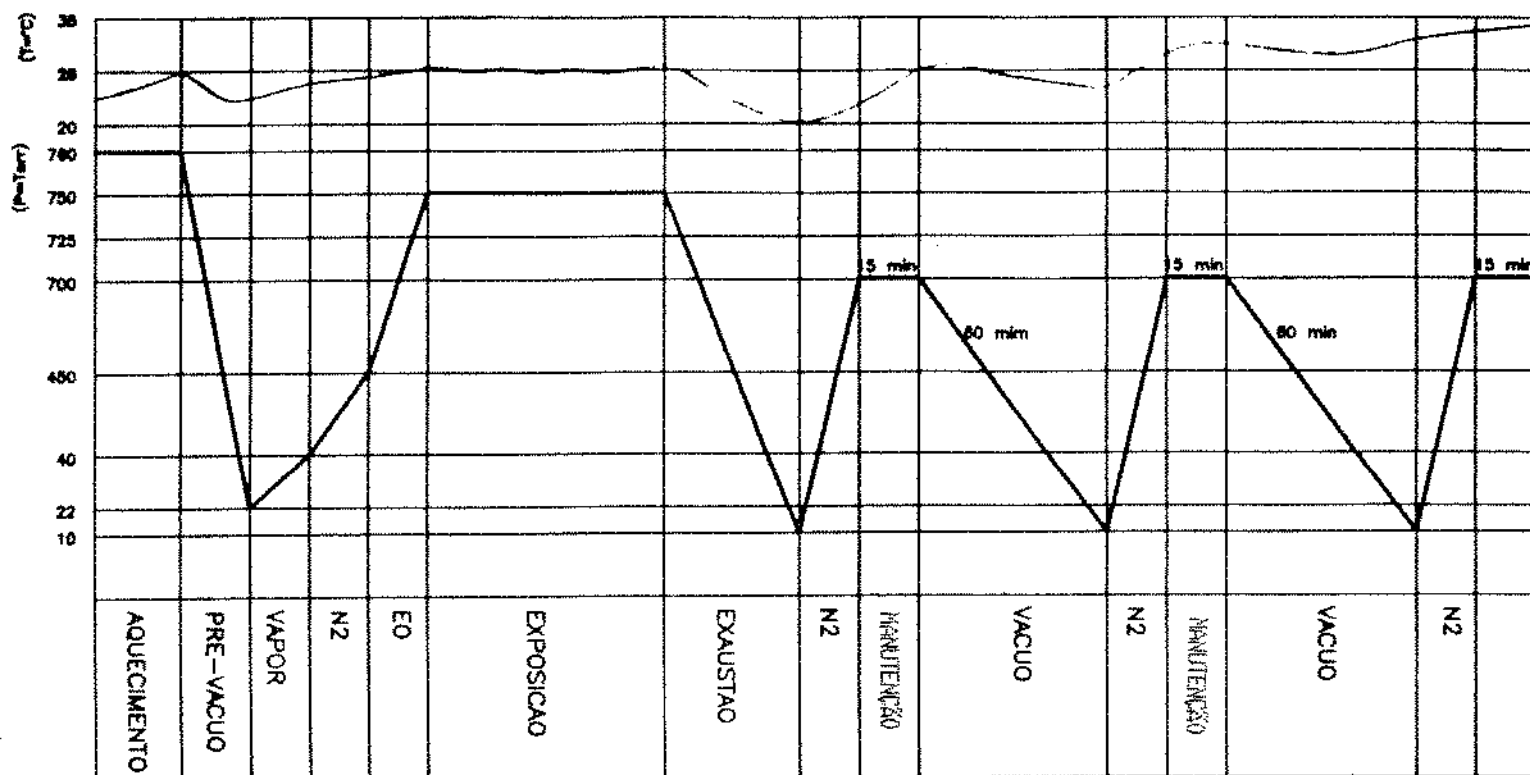
3.10. Cuidados nos Procedimentos Microbiológicos

Nos testes microbiológicos realizados, todos os materiais utilizados (meios de cultura, solução fisiológica, pérolas de vidro, etc) foram previamente esterilizados em autoclave à vapor d'água (121°C, 1,0-1,5 kg/cm², 18 min). Além disto, os procedimentos microbiológicos seguiram rigorosas técnicas assépticas.

Para minimizar a variabilidade inerente ao se manipular com Indicador Biológico, foram tomados os seguintes cuidados:

- realização de todos procedimentos por apenas uma pessoa.
- uso de um mesmo lote de cada meio de cultura do início ao fim do procedimento (produção dos Indicadores Biológicos e teste de esterilidade).
- uso do mesmo lote de Indicador Biológico em todo procedimento de avaliação de performance do mesmo.

Figura 7: Ciclo de Esterilização por Óxido de Etileno



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção dos Indicadores Biológicos

Os IBs foram produzidos seguindo metodologia descrita e os organismos foram identificados atendendo os requisitos apontados no item 2.2.4.1. Os resultados obtidos foram:

- . Gram : +
- . Catalase: +
- . Reação Voges-Proskauer: +
- . Produção de ácido a partir da glucose: +
- . Produção de ácido a partir da arabinose: +
- . Produção de ácido a partir da xilose: -
- . Produção de ácido a partir da manitol: +
- . Produção de pigmento preto a partir da tirosina: +
- . Hidrólise de amido: +
- . Uso de citrato: +
- . NO_2 a partir de NO_3 : +
- . Decomposição de caseína: +
- . Decomposição de tirosina: -
- . Formação de Indol: -
- . Decomposição da gelatina: +
- . Gás da glucose: -

A carga de esporos encontrada nos IBs foi a seguinte:

A*	- Brasil/AMSCO	= $3,4 \times 10^6$	esporos/fita
B*	- Brasil/DSM	= $3,6 \times 10^6$	esporos/fita
C*	- AMSCO (GL 121 D)	= $1,1 \times 10^6$	esporos/fita
D1*	- Brasil/AMSCO	= $9,2 \times 10^5$	esporos/fita
D2*	- Brasil/AMSCO	= $7,6 \times 10^5$	esporos/fita
D3*	- AMSCO (GL 092 B)	= $2,0 \times 10^6$	esporos/fita

*A identificação dos IBs está descrita nos itens 3.5.1 e 3.5.2. A carga dos IBs AMSCO condiz com a reportada pelo fabricante.

4.2. Avaliação do Teor de Umidade dos IBs

Por ser a umidade (especialmente dos esporos - indiretamente do material de suporte) um fator que afeta a atividade antimicrobiana do óxido de etileno e por saber que a umidade dentro do refrigerador pode variar ao longo do tempo, definiu-se trabalhar com condições constantes de umidade no armazenamento para reduzir o número de variáveis na avaliação de resistência dos IBs. Como na rotina de trabalho, os IBs são armazenados em refrigerador, optou-se ainda pela comparação entre estas duas formas de armazenamento (com e sem controle de umidade relativa).

Os resultados de umidade dos IBs A, B, e C nas diferentes condições de armazenamento estão descritos na tabela 7.

Nas duas primeiras análises, a avaliação foi feita em termos de peso total, considerando Peso Inicial e Peso Final (inclusive do papel alumínio que abrigou os IBs nos testes). Nas análises posteriores, este procedimento foi alterado, pesando-se antes e após a secagem, apenas os IBs.

Com tais resultados, observa-se que a umidade do IB C (AMSCO) é inferior aos IBs A e B (BRASIL). Uma vez que os IBs BRASIL usaram o mesmo material de suporte, que por sua vez diferia do IB AMSCO, buscou-se uma alternativa de papel para os IBs BRASIL que fosse menos higroscópico que o usado anteriormente, pois como concluído por DOYLE et alii (1970), esporos dessecados são mais resistentes que esporos não dessecados, conservando assim, o princípio de quando se desenvolve IB, busca-se o microrganismo mais resistente.

O papel filtro (250g/cm^3), fabricante Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S. A. foi avaliado e os resultados são mostrados na tabela 8.

Como o armazenamento sob refrigeração mostrou valores de umidade menores que sob condição controlada (confirmado pelos resultados da tabela 7), a sequência nos testes (avaliação do tipo de papel) prosseguiu com IBs armazenados sob refrigeração.

Tabela 7: Teor Médio de Umidade em IBs

IB*	Armazenamento*	Resultado (% Umidade)			
		R1	R2	R3	R4
A	1	2,9	3,5	3,8	7,3
A	2	2,9	5,0	4,8	10,4
B	1	2,5	3,4	-	-
B	2	3,2	4,4	-	-
C	1	1,4	2,4	2,1	4,8
C	2	2,1	3,0	2,6	7,1

* A = IB produzido a partir do IB AMSCO (lote GL 121 D)

B = IB produzido a partir de cepa de Coleção de Culturas
(DSM 675)

C = IB AMSCO (lote GL 121 D)

1 = sob refrigeração (5-7°C)

2 = sob refrigeração e UR controlada (5-7°C, 75,7% UR)

R = repetição

Tabela 8: Teor médio de Umidade em Papéis

Tipo de suporte	Resultado* (% Umidade)	
	Condição 1	Condição 2
papel filtro	8,5	5,6
polpa de madeira	10,2	6,9

* 1 = apenas o suporte de papel, sob refrigeração e UR controlada (5-7°C, 75,7% UR)

2 = suporte + esporos de *B. subtilis* var. *niger* (IB), sob refrigeração (5-7°C)

4.3. Avaliação da Resistência dos IBs

4.3.1. Padronização dos IBs

Seguindo a orientação da USP XXII (1990), os IBs foram avaliados em câmara BIER, considerando procedimentos de tempos de morte/sobrevivência para os IBs BRASIL e cálculo de valor D para o IB AMSCO. Os resultados (descritos na tabela 9), demonstram que os IBs estão padronizados. Ou seja, o procedimento de produção dos IBs descrito neste trabalho está validado.

Tabela 9: Avaliação de Resistência de IBs, usando Câmara BIER

IB [*]	Resultado (n° de sobreviventes/ n° amostras testadas)	
	Tempo de exposição ao EO ^{**}	
	15 min	58 min
A	20/20	0/20
B	20/20	0/20
C ^{***}	Tempo de morte = 16 min Tempo de sobrevivência = 38 min	

* A = IB produzido a partir do IB AMSCO (lote GL 121 D)

B = IB produzido a partir de cepa de Coleção de Culturas
(DSM 675)

C = IB AMSCO (lote GL 121 D)

** Condições de processo: 54+-1°C, 600+-30 mg/l, 60+-10% UR

*** Valores fornecidos pelo Fornecedor

4.3.2. Avaliação da Performance dos IBs X Condições de Armazenamento (1ª Fase)

Os IBs foram testados no esterilizador descrito, com as condições de processo e procedimentos descritos no item 3, e os resultados estão resumidos na tabela 10.

Tabela 10: Resultados do Teste de Esterilidade dos IBs A1, A2, B1, B2, C1 e C2

Ident. ciclo	Tempo de exposição ao EO* (min)	Resultados (n° amostras com crescimento/ n° amostras testadas)**					
		A1	A2	B1	B2	C1	C2**
T16	80	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
T17	80	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
T18	80	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
T13	100	6/20	12/20	18/20	20/20	20/20	16/20
T14	100	20/20	17/20	20/20	14/20	20/20	20/20
T15	100	19/20	19/20	18/20	18/20	20/20	20/20
T06	120	2/20	5/20	0/20	0/20	20/20	20/20
T07	120	2/20	2/20	0/20	0/20	5/20	1/20
T08	120	10/20	16/20	6/20	5/20	20/20	20/20
T19	140	0/20	4/20	1/20	0/20	20/20	20/20
T21	140	0/20	0/20	0/20	0/20	20/20	14/20
T22	140	0/20	1/20	0/20	0/20	17/20	7/20
T24	160	1/20	0/20	0/20	1/20	14/20	12/20
T25	160	0/20	2/20	0/20	0/20	16/20	10/20
T30	160	0/20	3/20	0/20	0/20	0/20	4/20
T11	180	0/20	0/20	0/20	0/20	10/20	5/20
T12	180	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20	2/20
T20	180	0/20	0/20	0/20	0/20	7/20	5/20
T26	200	0/20	2/20	0/20	0/20	0/20	2/20
T27	200	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	3/20
T31	200	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20	11/20
T28	220	1/20	1/20	0/20	0/20	1/20	6/20
T29	220	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	7/20
T32	220	0/20	1/20	0/20	0/20	0/20	5/20
T09	240	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
T10	240	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
T23	240	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20

*Condições de processos descritas no item 3.7.

**A1 = IB produzido a partir de IB AMSCO, sob refrigeração (5-7°C)

A2 = IB produzido a partir de IB AMSCO, sob refrigeração e UR controlada (5-7°C, 75,7% UR)

B1 = IB produzido a partir de cepa de Coleção de Culturas, sob refrigeração (5-7°C)

B2 = IB produzido a partir de cepa de Coleção de Culturas,
sob refrigeração e UR controlada (5-7°C, 75,7% UR)
C1 = IB AMSCO, sob refrigeração (5-7°C)
C2 = IB AMSCO, sob refrigeração e UR controlada
(5-7°C, 75,7% UR)

A resistência dos IBs foi calculada para cada condição, usando o procedimento de Stumbo, Murphy and Cochran (descrito no item 2.2.4.3) , denominado aqui D_S e o procedimento de Epstein-Hachigian, denominado D_H . Os resultados estão nas tabelas 11, 12, 13, 14, 15 e 16 (M e DP usando todos os resultados). O resultado obtido para IB C2 no ciclo T23 foi considerado "ponto fora da curva ".

Os dados de resistência foram avaliados pelo " Duncan's Multiple Range Test ", usando o programa de computador "Statistical Analyses System " (SAS, 1985) e os resultados estão descritos no Apêndice 9. Para entender esta avaliação, verifique neste Apêndice a primeira linha da página onde se identifica o que está sendo avaliado; verifique o valor dado em $Pr>F$ (número grifado), se este número for maior que 0,1000, os grupos de dados comparados não têm diferença significativa entre si (com 95% de nível de confiança); verifique na coluna inferior as letras de "Duncan Grouping " (letras grifadas), quando se tem a mesma letra, os grupos de dados comparados não têm diferença significativa (com 95% de confiança) entre eles. Os gráficos mostram a dispersão dos valores para cada grupo. Desta avaliação, observa-se:

- não há diferença significativa entre as 2 metodologias de cálculo de resistência de IBs aqui usadas (Stumbo, Murphy and Cochran e Epstein-Hachigian) - vide A1, A2, B1, B2, C1 e C2: $D_S \times D_H$.

- não há diferença significativa entre os 2 tipos de armazenamento aqui estudados (refrigeração: com e sem umidade relativa controlada) - vide D_S e D_H : A1xA2, B1xB2 e C1xC2, apesar que os valores D foram ligeiramente superiores na condição de refrigeração + umidade relativa controlada.

- não há diferença significativa entre as 2 fontes de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) - IB AMSCO e cepa liofilizada de Coleção de Culturas (DSM) - vide D_S e D_H : A1xB1xC1 e A2xB2XC2.

- há diferença significativa entre os IBs produzidos pela metodologia aqui descrita e o IB AMSCO - vide D_S e D_H : A1XB1XC1 e A2XB2XC2.

- há uma dispersão de dados menor no IB B quando comparado ao IB A e C - vide figuras A1XB1XC1 e A2XB2XC2 (D_S e D_H).

**Tabela 11: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB
Produzido a partir do IB AMSCO, Armazenado sob
Refrigeração (IB A1)**

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO (min)	Resultado (nº de amostras com crescimento/ nº de amostras testadas)	Valor D		
			D _S (min)	D _H (min)	
T16	80	20/20	-	-	
T17	80	20/20	-	-	
T18	80	20/20	-	-	
T13	100	6/20	14,17563	14,32836	
T14	100	20/20	-	-	
T15	100	19/20	15,25842	16,51544	
T06	120	2/20*	15,93312	15,98134	
T07	120	2/20*	15,93312	15,98134	
T08	120	10/20*	17,56309	17,93558	
T19	140	0/20	-	-	
T21	140	0/20	-	-	
T22	140	0/20	-	-	
T24	160	1/20	20,42768	20,45678	
T25	160	0/20	-	-	
T30	160	0/20	-	-	
T11	180	0/20	-	-	
T12	180	0/20	-	-	
T20	180	0/20	-	-	
T26	200	0/20	-	-	
T27	200	0/20	-	-	
T31	200	0/20	-	-	
T28	220	1/20	28,08806	28,12807	
T29	220	0/20	-	-	
T32	220	0/20	-	-	
T09	240	0/20	-	-	
T10	240	0/20	-	-	
T23	240	0/20	-	-	
			M	18,19701	18,47527
			DP	4,80048	4,67032

**Tabela 12: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB
Produzido a partir do IB AMSCO, Armazenado sob
Refrigeração e UR Controlada (IB A2)**

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO (min)	Resultado (n° de amostras com crescimento/ n° de amostras testadas)	Valor D	
			D _S (min)	D _H (min)
T16	80	20/20	-	-
T17	80	20/20	-	-
T18	80	20/20	-	-
T13	100	12/20*	14,80751	15,22208
T14	100	17/20*	15,14678	15,99144
T15	100	19/20*	15,25842	16,51544
T06	120	5/20	16,82194	16,96707
T07	120	2/20	15,93312	15,98134
T08	120	16/20	18,10394	18,97304
T19	140	4/20	19,36255	19,49087
T21	140	0/20	-	-
T22	140	1/20	17,87422	17,89968
T24	160	0/20	-	-
T25	160	2/20	21,24416	21,30846
T30	160	3/20	21,75276	21,85634
T11	180	0/20	-	-
T12	180	0/20	-	-
T20	180	0/20	-	-
T26	200	2/20	26,55520	26,63558
T27	200	0/20	-	-
T31	200	0/20	-	-
T28	220	1/20	28,08806	28,12807
T29	220	0/20	-	-
T32	220	1/20	28,08806	28,12807
T09	240	0/20	-	-
T10	240	0/20	-	-
T23	240	0/20	-	-
			M	19,92590
			DP	4,88629
				20,23826
				4,67880

**Tabela 13: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB
Produzido a partir de Cepa de Coleção de Culturas,
Armazenado sob Refrigeração (IB B1)**

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO (min)	Resultado (nº de amostras com crescimento/ nº de amostras testadas)	Valor D	
			D _S (min)	D _H (min)
T16	80	20/20	-	-
T17	80	20/20	-	-
T18	80	20/20	-	-
T13	100	18/20*	15,14678	16,14453
T14	100	20/20	-	-
T15	100	18/20*	15,14678	16,14453
T06	120	0/20	-	-
T07	120	0/20	-	-
T08	120	6/20	16,95111	17,13310
T19	140	1/20	17,81775	17,84305
T21	140	0/20	-	-
T22	140	0/20	-	-
T24	160	0/20	-	-
T25	160	0/20	-	-
T30	160	0/20	-	-
T11	180	0/20	-	-
T12	180	0/20	-	-
T20	180	0/20	-	-
T26	200	0/20	-	-
T27	200	0/20	-	-
T31	200	0/20	-	-
T28	220	0/20	-	-
T29	220	0/20	-	-
T32	220	0/20	-	-
T09	240	0/20	-	-
T10	240	0/20	-	-
T23	240	0/20	-	-
			M	16,26560
			DP	1,33947
				16,81630
				0,82807

**Tabela 14: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB
Produzido a partir de Cepa de Coleção de Culturas,
Armazenado sob Refrigeração e UR Controlada
(IB B2)**

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO (min)	Resultado (n° de amostras com crescimento/ n° de amostras testadas)	Valor D	
			D _S (min)	D _H (min)
T16	80	20/20	-	-
T17	80	20/20	-	-
T18	80	20/20	-	-
T13	100	20/20	-	-
T14	100	14/20*	14,90045	15,44247
T15	100	18/20*	15,14678	16,14453
T06	120	0/20	-	-
T07	120	0/20	-	-
T08	120	5/20	16,76361	16,90773
T19	140	0/20	-	-
T21	140	0/20	-	-
T22	140	0/20	-	-
T24	160	1/20	20,36314	20,39206
T25	160	0/20	-	-
T30	160	0/20	-	-
T11	180	0/20	-	-
T12	180	0/20	-	-
T20	180	0/20	-	-
T26	200	0/20	-	-
T27	200	0/20	-	-
T31	200	0/20	-	-
T28	220	0/20	-	-
T29	220	0/20	-	-
T32	220	0/20	-	-
T09	240	0/20	-	-
T10	240	0/20	-	-
T23	240	0/20	-	-
			M	16,79349
			DP	2,51916
				17,22169
				2,19664

**Tabela 15: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB
AMSCO, Armazenado sob Refrigeração (IB C1)**

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO (min)	Resultado (n° de amostras com crescimento/ n° de amostras testadas)	Valor D	
			D _S (min)	D _H (min)
T16	80	20/20	-	-
T17	80	20/20	-	-
T18	80	20/20	-	-
T13	100	20/20	-	-
T14	100	20/20	-	-
T15	100	20/20	-	-
T06	120	20/20	-	-
T07	120	5/20	18,06289	18,23032
T08	120	20/20	-	-
T19	140	20/20	-	-
T21	140	20/20	-	-
T22	140	17/20	22,90585	24,29180
T24	160	14/20*	25,82188	26,84231
T25	160	16/20*	26,06583	27,42223
T30	160	0/20	-	-
T11	180	10/20*	28,38032	29,02979
T12	180	1/20	24,51506	24,55231
T20	180	7/20*	27,70371	28,09386
T26	200	0/20	-	-
T27	200	0/20	-	-
T31	200	1/20	27,23896	27,28034
T28	220	1/20	29,96286	30,00838
T29	220	0/20	-	-
T32	220	0/20	-	-
T09	240	0/20	-	-
T10	240	0/20	-	-
T23	240	0/20	-	-
M			25,62860	26,19459
DP			3,552454	3,51858

**Tabela 16: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno do IB
AMSCO, Armazenado sob Refrigeração e UR Controlada
(IB C2)**

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO (min)	Resultado (nº de amostras com crescimento/ nº de amostras testadas)	Valor D	
			D _S (min)	D _H (min)
T16	80	20/20	-	-
T17	80	20/20	-	-
T18	80	20/20	-	-
T13	100	16/20	16,29114	17,13889
T14	100	20/20	-	-
T15	100	20/20	-	-
T06	120	20/20	-	-
T07	120	1/20	16,34337	16,36820
T08	120	20/20	-	-
T19	140	20/20	-	-
T21	140	14/20	22,59414	23,48702
T22	140	7/20	21,54733	21,85078
T24	160	12/20*	25,54587	26,31873
T25	160	10/20*	25,22695	25,80425
T30	160	4/20*	23,73759	23,90641
T11	180	5/20*	27,09434	27,34549
T12	180	2/20*	25,56312	25,64588
T20	180	5/20*	27,09434	27,34549
T26	200	2/20*	28,40347	28,49542
T27	200	3/20*	29,13200	29,28067
T31	200	11/20*	31,74084	32,57820
T28	220	6/20*	33,51476	33,90312
T29	220	7/20*	33,86009	34,33694
T32	220	5/20*	33,11531	33,42227
T09	240	0/20	-	-
T10	240	0/20	-	-
T23	240	2/20	34,08416	34,19451
			M	26,75816
			DP	5,59270
				27,14249
				5,56422

4.3.3. Avaliação da Influência do Tipo de Papel Suporte (2^a Fase)

A influência do tipo de papel suporte na resistência dos esporos ao óxido de etileno foi avaliada comparando os IBs aqui produzidos, usando os esporos provenientes de mesma fonte, alterando-se apenas o papel, que foram comparados ao IB AMSCO. Resultados obtidos estão descritos na tabela 17.

O valor D foi calculado usando os seguintes procedimentos (referências no item 2.2.4.3):

- Stumbo, Murphy & Cochran - denominado D_S
- Spearman-Kärber - denominado D_{Usk}
- Epstein-Hachigian - denominado D_H

Os valores estatísticos estão resumidos na tabela 18. Destes valores, observa-se que:

- não há diferença significativa entre os 2 tipos de papel suporte estudados (D1 e D2).
- os valores D dos IBs são maiores quando comparados aos valores da primeira fase do experimento (item 4.3.2), o que pode ser explicado pelo intervalo menor de temperatura observado nos ciclos de exposição ao gás (vide item 4.3.4), pelo menor número de ciclos (menor número de replicatas/dados) e pela melhor padronização do tamanho das fitas carregadoras (cuidadosamente realizada nesta fase).

Tabela 17: Resultados do Teste de Esterilidade dos IBs D1, D2 e D3

Ident. Ciclo	Tempo de exposição ao EO * (min)	Resultados (nº de amostras com crescimento/ nº de amostras testadas)		
		D1	D2	D3 **
T33	80	20/20	19/20	20/20
T34	100	20/20	20/20	20/20
T35	120	20/20	20/20	20/20
T37	140	10/20	16/20	20/20
T39	160	4/20	1/20	20/20
T40	180	3/20	1/20	20/20
T38	200	0/20	0/20	5/20
T36	220	0/20	0/20	0/20

* Condições de processo descritas no item 3.7.

**D1 = IB produzido a partir de IB AMSCO, em polpa de madeira

D2 = IB produzido a partir do IB AMSCO, em papel filtro.

D3 = IB AMSCO, lote GL 092 B

Tabela 18: Cálculo da Resistência ao Óxido de Etileno dos IBs D1, D2 e D3

Tempo de exposição ao EO (min)	IB D1		IB D2		IB D3	
	D _S (min)	D _H	D _S (min)	D _H	D _S (min)	D _H
80	-	-	14,80200	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-
140	22,86475	22,86489	24,67334	24,67350	-	-
160	24,18671	24,18686	22,31286	22,31300	-	-
180	26,65528	26,65545	25,10197	25,10212	-	-
200	-	-	-	-	29,23072	29,23091
220	-	-	-	-	-	-

M	24,56891	24,55907	24,02939	24,02954	29,23072	29,23091
DP	1,92395	1,93728	1,50193	1,50193	-	-

	IB D1		IB D2		IB D3	
D _{Usk}	23,65440		24,13760		29,76313	

4.3.4. Tempo de Esterilização

As condições de processo observadas nos ciclos realizados durante todo o trabalho estão descritas na tabela 19, sendo que os intervalos experimentais verificados foram:

1ª Fase: T = 28,5-32,1 °C
(T06 a T32) UR = 67,5-84,8 %
C = 694,0-720,4 mg/l

2ª Fase: T = 27,1-30,5 °C
(T33 a T40) UR = 70,5-80,8 %
C = 697,4-720,0 mg/l

Uma vez que estes parâmetros influenciam a atividade antimicrobiana do óxido de etileno, devem ser controlados e mantidos dentro do intervalo estudado, preferencialmente nos limites superiores, por maior segurança.

Para definir o processo de esterilização, indica-se usar o maior valor de resistência observado. Ou seja, a resistência do IB AMSCO.

Usando então D = 29,76 min, considerando fator de segurança de 10^{-6} e partindo de uma carga microbiana estimada na ordem de 10^6 UFC/produto, deve-se percorrer 12D. Ou seja, $12 \times 29,76 = 357,12$ min $\approx$ 6 h (lembramos que a carga máxima observada em produtos médico-hospitalares é inferior a 10^6 UFC/produto, além de ser uma carga mista).

Assim, as condições indicadas de exposição ao Óxido de Etileno, considerando as características de carga de produtos, deve ser (no mínimo):

T = 27-32 °C
UR = 67-81 %
C = 694-720 mg/l
t = 6 h

Como se percebe, este é um processo de esterilização para produtos termo-sensíveis, dada a baixa temperatura de processo.

Tabela 19: Condições de Processo dos Ciclos de Exposição ao Óxido de Etileno

Ident. Ciclo	Tempo Injeção EO (seg)	T (°C)	Exposição ao EO		t (min)	Exaustão EO	
			UR*	C** (mg/l)		Mistura (min)	Residual (min)
T16	46	30,0-31,3	67,5	695,6	80	3	225
T17	220	30,0-31,2	76,3	705,1	80	3	240
T18	47	30,2-31,9	70,9	694,2	80	3	232
T13	23	30,0-31,3	79,2	702,5	100	3	302
T14	31	29,5-30,5	76,8	706,7	100	3	225
T15	30	29,9-31,0	80,1	705,6	100	2	227
T06	45	30,2-31,0	74,2	694,0	120	2	231
T07	67	30,4-31,0	74,2	703,2	120	2	216
T08	60	29,9-30,7	78,9	706,3	120	2	234
T19	31	29,6-32,1	75,7	705,3	140	4	208
T21	38	28,8-30,9	78,9	703,5	140	3	228
T22	23	28,8-30,6	82,0	720,4	140	3	225
T24	30	28,5-30,1	84,8	705,3	160	3	230
T25	30	30,0-31,2	76,3	705,1	160	3	223
T30	23	30,5-31,8	73,7	703,7	160	3	223
T11	37	29,1-30,7	75,9	694,6	180	3	258
T12	30	29,1-31,5	72,5	697,4	180	1	173
T20	30	29,7-31,8	70,9	689,8	180	3	234
T26	83	29,8-31,2	73,3	705,1	200	2	212
T27	38	29,5-30,8	78,0	710,6	200	3	182
T31	45	29,8-31,0	77,2	710,2	200	2	228
T28	75	29,5-31,8	70,9	701,4	220	3	202
T29	30	29,8-31,0	80,1	714,8	220	3	183
T32	121	29,8-30,9	78,0	705,8	220	3	190
T09	68	28,9-30,5	79,8	704,4	240	2	226
T10	29	29,8-30,8	78,0	708,3	240	3	240
T23	30	29,2-30,5	82,9	716,0	240	3	220
T33	23	27,8-29,5	74,8	697,4	80	3	265
T34	23	27,8-29,8	80,8	720,0	100	1	245
T35	90	27,8-29,0	79,9	710,2	120	3	182
T37	67	28,1-31,0	70,5	707,9	140	2	192
T39	106	27,8-30,5	71,4	706,7	160	3	226
T40	420	27,2-30,0	72,3	707,9	180	3	220
T38	1140	27,1-29,5	75,7	697,4	200	3	480
T36	467	27,1-30,5	71,4	706,7	220	3	360

* Concentração calculada de acordo com item 2.2.5 (AAMI, 1992a)

* UR calculada de acordo com item 2.2.5 (AAMI, 1992a), usando valores de Pg dado por WEAST et alii (1986/1987), considerando temperatura inicial de processo.

5. CONCLUSÕES

Dentro do objetivo do trabalho e da análise dos dados encontrados na avaliação da resistência ao óxido de etileno de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*), conclui-se:

- os procedimentos aqui descritos de produção de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) em fita carregadora (IB) atende os requisitos de padronização para IBs usado em esterilização por óxido de etileno preconizado pela USP XXII (1990) e AAMI (1986), sendo observado para o lote avaliado:

- . tempo mínimo de sobrevivência = 15 min
- . tempo máximo de morte = 58 min
- . concentração de microrganismos na ordem de 10^6 esporos/fita carregadora

- não há diferença significativa (com 95% de nível de confiança) na resistência dos IBs produzidos a partir de esporos recuperados de IB AMSCO (fita carregadora) - IB A - e de esporos liofilizados de cepa de Coleção de Culturas - DSM (IB B):

- . $D_s = 18,197$ (IB A) e $16,266$ min (IB B) - armazenado sob refrigeração.
- . $D_s = 19,926$ (IB A) e $16,793$ min (IB B) - armazenado sob refrigeração + UR controlada.

- não há diferença significativa (com nível de 95% de confiança) na resistência de IBs armazenados sob refrigeração ($5-7^{\circ}\text{C}$) e sob refrigeração + UR controlada ($5-7^{\circ}\text{C}$, 75,7% UR), respectivamente:

- . $D_s = 18,197$ e $19,926$ min para IB A
- . $D_s = 16,266$ e $16,793$ min para IB B
- . $D_s = 25,629$ e $26,758$ min para IB C

- não há diferença significativa (com 95% de nível de confiança) na resistência de IBs produzidos em fitas carregadoras de polpa de madeira (350 g/cm^2 , 10,2% umidade) ou papel filtro (250 g/cm^2 , 8,5% de umidade), que possuem maior e menor gramatura e higroscopicidade, respectivamente. $D_s = 24,569$ e $24,029$ min, respectivamente.

- não há diferença significativa (com 95% de nível de confiança) entre as 2 metodologias de cálculo de resistência de IBs aqui usadas (Stumbo, Murphy & Cochran e Epstein-Hachigian).

. A1: $D_s = 18,197$ min

$D_H = 18,475$ min

B1: $D_s = 16,266$ min

$D_H = 16,816$ min

C1: $D_s = 25,629$ min

$D_H = 26,195$ min

- há diferença significativa (com 95% de nível de confiança) entre os IBs produzidos (metodologia aqui descrita) e o IB AMSCO (valores D acima). Os esporos dos primeiros têm resistência menor (16-37%).

- como mostra o levantamento bibliográfico, a padronização da produção de IBs e o controle dos parâmetros do processo de esterilização deve ser rigoroso, pois a variabilidade inerente dos microrganismos e o grande número de variáveis da esterilização por óxido de etileno que afetam a resistência do *Bacillus subtilis* var. *niger* (*globigii*) torna este processo bastante crítico, o que se confirmou neste experimento com a diferença no valor D observado entre a 1ª e 2ª fases do trabalho (temperatura menor dos ciclos, melhor padronização do tamanho das fitas carregadores e menor número de ciclos realizados na 2ª fase):

D_S - IB BRASIL em polpa de madeira - 1^a fase: 18,475 min
2^a fase: 24,569 min

- IB AMSCO - 1^a fase: 25,629 min
2^a fase: 29,231 min

- com as características de processo aqui estudadas (carga, mistura EO/N₂, embalagem, etc), as condições de esterilização (exposição ao EO) devem ser:

T = 27 - 32 °C
UR = 67 - 81 %
C = 694 - 720 mg/l
t = 6 h

e o tempo mínimo de retirada de EO é de 173 minutos.

Baseado nestes dados e seguindo as etapas descritas por CAPUTO & MASCOLI (1980) - item 2.3, o IB produzido como descrito neste experimento está validado para monitorar a eficácia do processo de esterilização por óxido de etileno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. AAMI (1986) American National Standard for Biological Indicators for Ethylene Oxide Sterilization Processes in Health Care Facilities (ANSI/AAMI ST 21). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992.33.
002. AAMI (1987a) American National Standard for Automatic, General-Purpose Ethylene Oxide Sterilizers and Ethylene Oxide Sterilant Sources Intended for Use in Health Care Facilities. (ANSI/AAMI ST 24). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 339.
003. AAMI (1987b) Good Hospital Practice: Ethylene Oxide Gas-Ventilation Recommendations and Safe Use (AAMI GUR). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 401.
004. AAMI (1988a) Guideline for Industrial Ethylene Oxide Sterilization of Medical Devices (ANSI/AAMI ST 27). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 275.
005. AAMI (1988b) Recommended Practice for Determining Residual in Medical Devices (ANSI/AAMI ST 29) In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 303.
006. AAMI (1989) Determining Residual Ethylene Chlorohydrin and Ethylene Glycol in Medical Devices (ANSI/AAMI ST 30). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 323.

007. AAMI (1991a) Sterilization of Healthcare Products (ISO/TC 198/ WG 1 N13) Published by Association for the Advancement of Medical Instrumentation.
008. AAMI (1991b) Sterilization of Healthcare Products - Biological Indicators - Part 1: General (ISO/TC 198/ WG 4 N10). Published by Association for the Advancement of Medical Instrumentation.
009. AAMI (1991c) Guideline for the use of Ethylene Oxide and Steam Biological Indicators in Industrial Sterilization Processes (ANSI/AAMI ST 34) In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 65.
010. AAMI (1992a) BIER/EO Gas Vessels (ANSI/AAMI ST 44). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 1.
011. AAMI (1992b) Good Hospital Practice: Ethylene Oxide Sterilization and Sterility Assurance (ANSI/AAMI ST 41). In: *AAMI Standards and Recommended Practices. Vol 1: Sterilization.* 1992. 339.
012. ASTM E 104 - 85 (1989) Standard Practice for Maintaining Constant Relative Humidity by means of Aqueous Solutions. *Annual Book of ASTM Standards. Sec 14. Vol 14.02.* 796-800.
013. BACHMAN, J. (1991) Sampling Strategies for Personal Monitoring. *Medical Device & Diagnostic Industry.* Dec. 37-39.
014. BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M. & KING, N.R. (1981) Resistance and structure of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology.* 50. 379-390.

015. BORIS, C. & GRAHAM, G. S. (1985) The effect of Recovery medium and test methodology on Biological Indicators. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Feb. 43-48.
016. BLAKE, D.F. & STUMBO, C.R. (1970) Ethylene Oxide resistance of microorganisms important in spoilage of acid and high-acid foods. *J.Food Science*. 35.26-29.
017. BLOCK, S.S. (1983) *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 3rd. Edition. Lea & Febiger ed. Philadelphia
018. BRUCH, C.W. (1961) Gaseous sterilization. *Annu. Rev. Microbiology*. 15. 245-262.
019. BUHLMAN, X., GAY, M. & SCHILLER, I. (1973) Test objects containing *Bacillus stearothermophilus* spores for the monitoring of anti-microbial treatment in steam autoclaves. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 48. 223-244.
020. BUSTA, F.F. & ORDAL, Z.J. (1964) Use of calcium dipicolinate for enumeration of total viable endospore populations without heat-activation. *Applied Microbiology*. 12.106-110.
021. CAPUTO, R.A. & MASCOLI, C.C. (1980) The design and use of Biological Indicators for Sterilization-Cycle Validation. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Aug. 23-43.
022. CAPUTO, R.A. & ODLAUG, T.E. (1983) Sterilization with Ethylene Oxide and others gases. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 3rd. Edition. Block, S.S. Lea & Febiger ed. Philadelphia. 47-64.

023. CAPUTO, R.A. & ROHN, K.J. (1982) The effects of EtO sterilization variables on BI performance. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Jul. 37-41, 68-69.
024. CAPUTO, R.A.; ROHN, K.J. & MASCOLI, C.C. (1980) Recovery of Biological Indicator Organisms after sublethal sterilization treatment. *Journal of Parenteral Drug Association*. 34(5). 394-397.
025. CHRISTENSEN, E.A. & KRISTENSEN, H. (1979) Biological Indicators for the control of Ethylene Oxide Sterilization. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect B*, 87. 147-154.
026. COOK, A.M. & BROWN, M.R.W. (1960) Preliminary studies of the heat resistance of bacterial spores on paper carriers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 17.116T-118T.
027. COOK, A.M. & GILBERT, R.J. (1968) Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery conditions on the colony count of unheated and heated spores. *Journal of Food technology*. 3. 285-294.
028. COOK, A.M. & GILBERT, R.J. (1969) The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 32. 96-102.
029. DADD, A.H. & DALEY, G.M. (1980) Resistance of micro-organisms to inactivation by gaseous ethylene oxide. *Journal of Applied Bacteriology*. 49. 89-101.

030. DADD, A.H. & DALEY, G.M. (1982) Role of the coat in resistance of bacterial spores to inactivation by Ethylene Oxide. *Journal of Applied Bacteriology*. 53. 109-116.
031. DADD, A.H., MCCORMICK, K.E. & DALEY, G.M. (1983) Factors influencing the resistance of biological monitors to ethylene oxide. *Journal of Applied Bacteriology*. 55. 39-48.
032. DADD, A. H.; TOWN, M. M. & MCCORMICK, K. E. (1985) The influence of water on the resistance of spores to inactivation by gaseous ethylene oxide. *Journal of Applied Bacteriology*. 58(6). 613-621.
033. DARRINGTON, H. (1991) Herbs and Spices: the Lion roars. *Food Manufactue*. Nov. 21.
034. DE LA OSA, J. M.; BENEZET, A.; BOTAS, M.; OLMO, N. & PÉREZ FLORÉZ, F. (1991) Estudio Comparativo de La Contaminacion por *Enterobacteriaceae* en pimentones tratados y sin tratar con Oxido de etileno. *Alimentaria*. Jun. 57-58.
035. DOLOVICH, J. & BELL, B. (1978) Allergy to a product(s) of Ethylene Oxide gas. Demonstration of IgE and IgG antibodies and hapten specificity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 62. 30-32.
036. DOYLE, J.E. & ERNST, R.R. (1967) Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores occluded in water - insoluble crystals to three sterilization agents. *Applied Microbiology*. 15(4). 726-730.

037. DOYLE, J.E. & ERNST, R.R. (1968) Influence of various pretreatments (carriers, desiccation and relative cleanliness) on the destruction of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores with gaseous ethylene oxide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57 (3). 433-436
038. DOYLE, J.E.; McDANIEL; A. W.; WEST, K. L.; WHITBOURNE, J. E. & ERNST, R. R. (1970) Ethylene Oxide resistance of nondesiccated and desiccated spores of *Bacillus subtilis* var. *niger* hermetically sealed in various polymeric films. *Appl. Microbiol.* 20 (5). 793-797.
039. EHRENBERG, L.; HIESCHE, K. D.; OSTERMAN-GOLDAR, S. & WENBERG, I. (1974) Evaluation of genetic risks of alkylating agents. Tissue doses in the mouse from air combined with ethylene oxide. *Mutation Research*. 24. 83-103.
040. ELLIS, J. R. (1990) EtO: Does it have a future? *Medical Device & Diagnostic Industry*. 12 (2). 50-51.
041. ERNST, R.R. & SHULL, J.J. (1962a) Ethylene Oxide Gaseous Sterilization. I. Concentration and temperature effects. *Appl. Microbiol.* 10. 337-341.
042. ERNST, R.R. & SHULL, J.J. (1962b) Ethylene Oxide Gaseous Sterilization. II. Influence of method of humidification. *Applied Microbiology*. 10. 342-344.
043. FARKAS, J. & ANDRÁSSY, É. (1988) Comparative Analysis of Spices decontaminated by Ethylene Oxide or Gamma Radiation. *Acta Alimentaria*. 17 (1). 77-94.
044. FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (1988) 4a. ed. Atheneu Ed. SPaulo, Brasil. V.5.1.1.

045. FIELDS, M. (1975) *Método para Estudo das Bactérias Termofílicas esporulantes*. Tradução de YOKOYA, F. e CANHOZ, V.P. FTPDC. 23
046. FIELDS, M.L. & FRANK, H.A. (1969) Dipicolinate-induced germination of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Bacteriology*. 97. 464-465.
047. FRANCO, S. L.; GIMÉNEZ, J. L.; SÁNCHEZ, F. M. & ROMOJARO, F. (1986) Effectiveness of Ethylene Oxide and Gamma Irradiation on the Microbiological Population of three Types of Paprika. *Journal of Food Science*. 51 (6). 1571-1574.
048. FRAZIER, W.C. & WERTHOFF, D.C. (1978) *Food microbiology*. Mc GrawHill , New York.
049. FUTTER, B.V. & RICHARDSON, G. (1970a) Viability of clostridial spores and the requirements of damaged organisms. I. Method of colony count, period and temperature of incubation, and pH value of the medium. *Journal of Applied Bacteriology*. 33. 321-330.
050. FUTTER, B.V. & RICHARDSON, G. (1970b) Viability of clostridial spores and requirements of damaged organisms. II. Gaseous environment and redox potentials. *Journal of Applied Bacteriology*. 33. 331-341.
051. GILBERT, G.L.; GAMBILL, V.M.; SPINER, D.R.; HOFFMAN, R.K. & PHILLIPS, C.R. (1964) Effect of moisture on ethylene oxide sterilization. *Appl. Microbiol.* 12 (6). 496-503.
052. GILLIS, J. (1982) Outside Preconditioning in EtO Sterilization. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Jan. 24-27.

053. GILLIS, J. R. & BRUCH, C. W. (1983) Controlling Eto Exposure in the Work Environment. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Oct. 35, 37.
054. GORDON, R.E.; HAYNES, W. C. & PANG, C. H. (1973) The Genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook* n^O427. U.S. Dept. of Agriculture. 1-14, 36-41, 182-183.
055. GORMAN, S.P.; SCOTT, E.M. & HUTCHINSON, E.P. (1984) Emergence and development of resistance to antimicrobial chemicals and heat in spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 57. 153-163.
056. GORMAN, S.P.; SCOTT, E.M. & HUTCHINSON, E.P. (1985) Thermal resistance variations due to post-harvest treatments in *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Applied Bacteriology*. 59. 555-560.
057. GRAHAM, G.S. (1986) Production of spores and preparation of spores suspensions and monitors. In: *Biological Monitoring of Sterilization*. Published by EUCOMED. 140-173.
058. GURNEY, T.R. & QUESNEL, L.B. (1980) Thermal activation and dry heat inactivation of spores of *Bacillus subtilis* MD2 and *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Journal of Applied Bacteriology*. 48. 231-247.
059. HACHIGIAN, J. & SCHLESINGER, R. J. (1991) Analysis of quantal response data from bacterial destruction studies in Sterilization: the Stumbo estimate is biased. *Journal of Applied Bacteriology*. 71. 460-466.
060. HALVORSON, H. O. & ZIEGLER, N. R. (1933) Applications of Statistics to problems in Bacteriology. *Journal of Bacteriology*. 25. 101-121.

061. HASTRUP, B. (1986) Use of Biological monitors for Validation and cycle Control in Ethylene Oxide Sterilization. In: *Biological Monitoring of Sterilization*. Published by EUROMED. 57-71.
062. HAWLEY, A. (1982) Commercial Ethylene Oxide Sterilization. *Food, Flavouring, Ingredients, Packaging and Processing*. 4 (2). 55-57.
063. HITCHINS, A.D.; GREENE, R.A. & SLEPECKY, R.A. (1972) Effect of carbon source on size and associated properties of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*. 110. 392-401.
064. JENKINSON, H.F.; SAWYER, W.D. & MANDELSTAM, J. (1981) Synthesis and order of assembly of spore coat proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*. 123. 1-16.
065. JONES, A. & WINEGAR, M. (1991) The future of In-house EtO Sterilization for the small to Midsize Medical Device Company. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Oct. 67-71.
066. JORDY (1981) Residues in meat products made with ethylene oxide-gassed spices. *Fleischwirtsch.* 61 (11). 1712.
067. KAYE, S. & PHILLIPS, C.R. (1949) The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. IV. The effect of moisture. *Am. J. Hyg.* 50. 296-300.
068. KERELUK, K.; GAMMON, R.A. & LLOYD, R.S. (1970a) Microbiological Aspects of Ethylene Oxide Sterilization. II. Microbial Resistance to Ethylene Oxide. *Applied Microbiology*. 19(1). 152-156.

069. KERELUK, K.; GAMMON, R.A. & LLOYD, R.S. (1970b)
Microbiological Aspects of Ethylene Oxide Sterilization.
III. Effects of humidity and water activity on the
sporicidal activity of ethylene oxide. *Applied
Microbiology*. 19(1). 157-162.
070. KERELUK, K.; GAMMON, R.A. & LLOYD, R.S. (1970c)
Microbiological Aspects of Ethylene Oxide Sterilization.
IV. Influence of Thickness of Polyethylene Oxide Film on
the sporicidal Activity of Ethylene Oxide. *Applied
Microbiology*. 19(1). 163-165.
071. KEYNAN, A.; EVENCHIK, Z.; HALVORSON, H. O. & HASTINGS, J.
M. (1964) Activation of bacterial endospores. *Journal of
Bacteriology*. 88. 313-318.
072. KNAPP, J.E.; ROSENBLATT, D.H. & ROSENBLATT, A.A. (1986)
Chlorine Dioxide as a Gaseous Sterilant. *Medical Device &
Diagnostic Industry*. Sep. 49-51.
073. KURUPPU, D.P.; SCHMIDT, K.; LANGERAK, D. IS; VAN DUREN, M.D.
A. & FARKAS, J. (1985) Effects of Irradiation and
Fumigation on the antioxidative properties of some spices.
Acta Alimentaria. 14 (4). 343-353.
074. KUZMINSKI, L.N.; HOWARD, G.L. & STUMBO, C.R. (1969)
Thermochemical factors influencing the death kinetics of
spores of *Clostridium botulinum* 62A. *J. Food Science*. 34.
561-567.
075. LEE, W. & ORDAL, Z. (1963) Reversible activation for
germination and subsequent changes in bacterial spores.
Journal of Bacteriology. 85. 207-217.

076. LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. (1964) Effect of sporulation medium on heat resistance, chemical composition and germination of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*. 87. 876-886.
077. LIU, T.S.; HOWARD, G.L. & STUMBO, C.R. (1968) Dichlorodifluoromethane - ethylene oxide mixture as a sterilant at elevated temperatures. *Food Technol.* 22. 86-89.
078. LYON, M. (1988) Comparison of Sterilizer Cycles for EtO residuals. *Medical Device & Diagnostic Industry*. May. 20-24, 66-67.
079. MACCLELLAND, D. C. (1976) The evolution of Sterilization. *AORN Journal*. 24 (1). 37 - 41.
080. MAIER, F.; AGOSTINI, G.; SCHABER, K. & KOCH, A. (1991) Ethylene Oxide Emission Control for Sterilization Processes in the Pharmaceutical Industry. *Drugs made in Germany*. 34 (2). 56-60.
081. MARIN, V. (1988) Sterilizzazione, disinfezione e sanitizzazione in campo alimentare. *Industrie Alimentari*. XXVII. Set. 731-734.
082. MARLETTA, J. & STUMBO, C. R. (1970) Some effects of Ethylene Oxide on *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Science*. 35. 627-631.
083. MICHAEL, G.T. & STUMBO, C.R. (1970) Ethylene Oxide Sterilization of *Salmonella senftenberg* and *Escherichia coli*: Death kinetics and mode of action. *J. Food Sci.* 35. 631-634.

084. MORRISSEY, R.F.; BRUCH, C.W.; SHARBAUGH, R.J.; FAVERO, M.S.; JARVES, W.R. & MASEFIELD, J. (1992) Sterility and Safety Assurance of Medical Devices. *Medical Device & Diagnostic Industry*. 14 (4). 78-81,115.
085. MORRISSEY, R.F. & PHILLIPS, G.B. (1990) New Challenges in Medical Product Sterilization. In: *The Medical Device Industry Science, Technology and Regulation in a Competitive Environment*. Edited by Estrin, N.F. Marcel Dekker, Inc. 517-529.
086. MOSELEY, B. E. B. (1984) Radiation Damage and its Repair in Non-sporulating Bacteria. In: *The Revival of injured Microbes*. Published for the Society for Applied Bacteriology by Academic Press. 147 - 174.
087. MULLICAN, C.L. & HOFFMAN, R.K. (1968) Dry Heat or Gaseous Chemical Resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger* spores included within water-soluble crystals. *American Society for Microbiology*. 16(8). 1110-1113.
088. NICHOLLS, A. (1986) Ethylene Oxide and anaphylaxis during Haemodialysis. *British Medical Journal*. 292. 1221-1222.
089. ODLAUG, T.E.; CAPUTO, R.A. & GRAHAM, G.S. (1981) Heat resistance and population stability of lyophilized *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 41. 1374-1377.
090. OXBORROW, G.S.; TWOHY, C. W. & DEMITRIUS, C. A. (1990) Determining the variability of BIER Vessels for EtO and Steam. *Medical Device & Diagnostic Industry*. May. 78-83.

091. PEDERSEN, M.R. & HANSEN, E.W. (1989) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and *E. coli* endotoxin by ethylene oxide. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 14. 373-380.
092. PERKINS, J. J. (1983) *Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences*. 2nd Edition, 8th Printing.
093. PFEIFFER, M. & OTTO, CH. (1986) The Influence of different incubation parameters on the Ethylene Oxide Resistance of Spores. In: *Biological Monitoring of Sterilization*. Published by EUCOMED. 219-221.
094. PFLUG, I. J. (1990) *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*. 7th. edition. Published by Environmental Sterilization Laboratory. Minneapolis, MN 55455.
095. PHILLIPS, C.R. (1968) Gaseous sterilization. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 1st. Edition. Edited by C.A. Lawrence and S.S. Block. Philadelphia, Lea & Febiger.
096. PHILLIPS, C.R. (1977) Gaseous sterilization. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 2nd. Edition. Edited by S.S. Block. Philadelphia, Lea & Febiger.
097. POOTHULLIL, J.; SHIMIZU, A.; DAY, R.P. & DOLOVICH, J. (1975) Anaphylaxis from the product(s) of ethylene gas. *Annals of Internal Medicine*. 82. 58-60.
098. PORTARIA nº 930, de 27 de agosto de 1992. Ministério da Saúde. Brasil.

099. *Portaria Interministerial no 4, de 31 de Julho de 1991. Ministério do Trabalho e de Previdência Social. Brasil.*
100. PRAT-MARÍN, A. & SANZ-GALLÉN, P. (1987) Aspectos Toxicológicos de La Exposición al Óxido de Etileno. *Rev. Saúde Publ. S.Paulo.* 21 (6). 523 - 528.
101. QUESNEL, L.B. (1984) Biological Indicators and Sterilization Processes. In: *The Revival of Injured Microbes.* Andrew, M.H.E. and Russel, A.D. Academic Press. 257-291.
102. REGO, A.; ALEXIS, C.P.; PARISI, A.N. & HARI, S.P. (1991) Comparing Simulation-Use Fluids in EtO-Residue Validation Tests. *Medical Device & Diagnostic Industry.* Dec. 56-58.
103. REICH, R.R. (1980 a) Effect of sublethal Ethylene Oxide Exposure on *Bacillus subtilis* spores and Biological Indicator Performance. *Journal of the Parenteral Drug Association.* 34(3). 200-211.
104. REICH, R.R. (1980 b) Storage Stability of *Bacillus subtilis* Ethylene Oxide Biological Indicators. *Applied and Environmental Microbiology.* 39(1). 277-279.
105. REICH, R. R.; ANDERSON, H.D. & SYRACUSE, K.A. (1984) The possible effect of EtO on the LAL reaction. *Medical Device & Diagnostic Industry.* Dec. 36-39.
106. REICH, R.R. & GRAHAM, G.S. (1986) Performance Requirements for Biological Indicators in the United States. In: *Biological Monitoring of Sterilization.* Published by EUCOMED. 30-41.

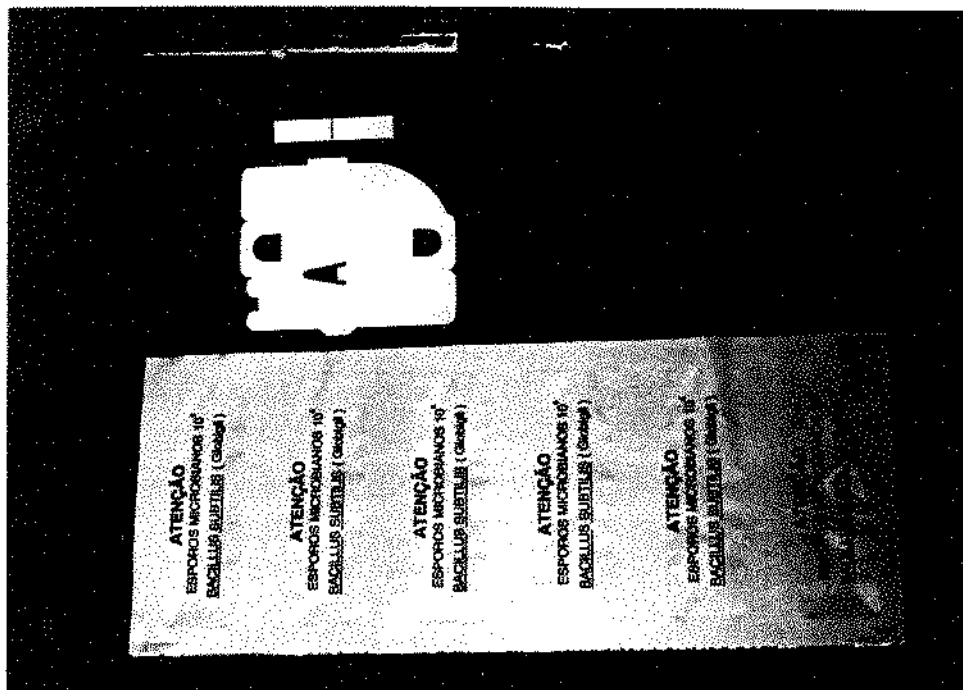
107. REICH, R.R. & HOUGHTLING, C. W (1985) Influence of Packaging and Device Construction on Product EtO Residual Levels and Deilvered Lethality. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Jan. 69-71, 183.
108. REICH, R.R. & MORIEN, L.L. (1982) Influence of Environmental Storage Relative Humidity on Biological Indicator Resistance, Viability and Moisture Content. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(3). 609-614.
109. REINIKAINEN, M.O. (1986) Regulatory Authority Requirements for Biological Monitoring in Europe. In: *Biological Monitoring of Sterilization*. Published by EUCOMED. 4-29.
110. RODRIGUES ALVES, M. & LEITE JANUZELLI, J.L. (1993) Materiais de Embalagem para Correlatos. Uso no Processo de Esterilização por Óxido de Etileno. *Revista de la O.F.I.L.* 3(5). 331-336.
111. ROMANO, S.J. & RENNER, J.A. (1975) Comparison of analytical methods for residual ethylene oxide analysis. *J. Pharm. Sci.* 64. 1412-1417.
112. ROSENBERG, V. & BOGI, W. (1987) Microwave Pasteurization, Sterilization, Blanching and Pest Control in the Food Industry. *Food Technology*. Jun. 92-99.
113. RUSIG, O. & YOKOYA, F. (1978) Uso de Óxido de Etileno e Brometo de Metila na Esterilização de pimenta Preta em Grão. *Revista Brasileira de tecnologia*. 9. 137-148.
114. RUSSEL, A.D.; HUGO, W.B. & AYLIFFE, G.A.J. (1982) Gaseous Sterilization. In: *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Blackwell Scientific Publications. 548-568.

115. SAMUELS, T.M. (1978) Personnel Exposures to Ethylene Oxide. *Hospital Topics*. 56(3). 27-33.
116. SAS (1985) *User's Guide Statistics*. 5.ed. North Caroline, SAS.
117. SCHNEIDER, B. (1993) Steam Sterilization of spices. *Fleischwirtschaft*. 73 (6). 646-648.
118. SLEPECKY, R.A. & FOSTER, J.W. (1959) Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties. *Journal of Bacteriology*. 78. 117-123.
119. SMITH, G.M.; PFLUG, I.J. & CHAPMAN, P.A. (1976) Effect of storage time and temperature and the variation among replicate tests (on different days) on the performance of spore disks and strips. *Appl. Environ. Microbiol.* 32. 257-263.
120. SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Section 13. 1104-1207.
121. SPICHER, G. (1988) Biological Indicators and Monitoring Systems for Validation and Cycle Control of Sterilization Processes. *Zbl. Bakt. Hyg.* A267, 463-484.
122. SPITZ, J. (1994) The relevance of microbial Challenge testing to Package Sterility. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Jan. 142-150.
123. STUMBO, C. (1948) A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in higher range. *Food Technology*. 2. 228-240.

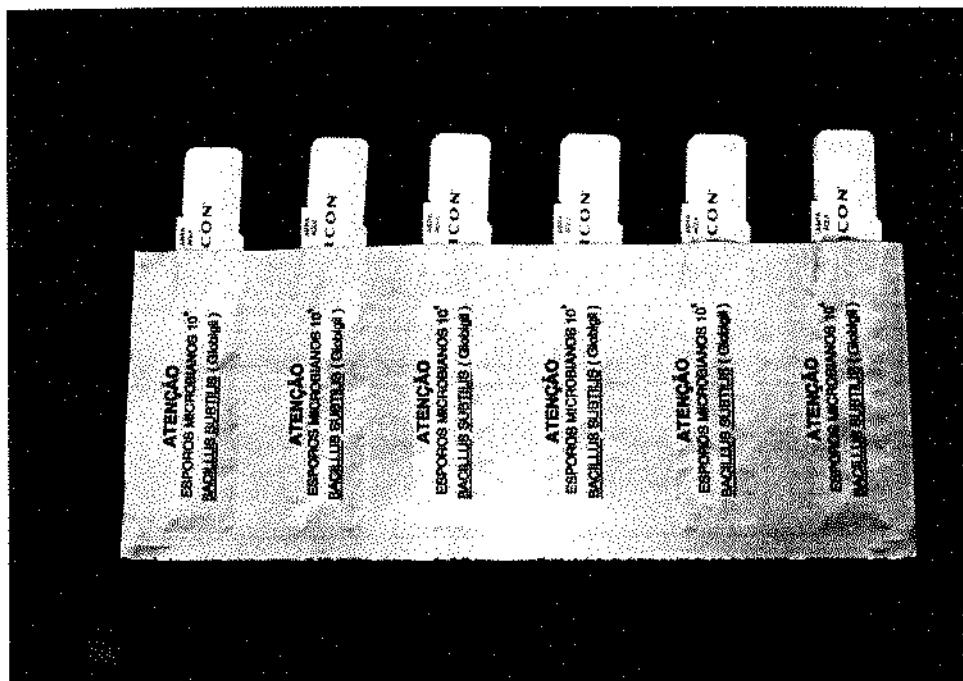
124. STUMBO, C.; MURPHY, J. R. & COCHRAN, J. (1950) Nature of thermal death time curves for *P.A. 3679* and *Clostridium botulinum*. *Food Technology*. 4. 321-326.
125. SZABAD, J. & KISS, I. (1979) Comparative Studies on the sanitising effects of Ethylene Oxide and Gamma Radiation in Ground Paprika. *Acta Alimentaria*. 8 (4). 383-395.
126. THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD OF INTERNATIONAL ASSOCIATION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (1980) *Microbial Ecology of foods*. Vol I. Factors affecting Life and Death of microorganisms. 171-192.
127. *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP XXII*. (1990) 22nd Revision. 171; 1483; 1625; 1705.
128. YOUNG, J. H. (1986) Comparison of In-Hospital and Industrial Sterilization of Medical Devices. *Medical Device & Diagnostic Industry*. Nov. 26-31.
129. WARTH, A.D. (1978) Relationship between the heat resistance of spores and optimum and maximum growth-temperature of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*. 134. 699-705.
130. WEAST, R. C. ; ASTLE, M. J. & BEGER, W. H. (1986/1987) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 67th ed. D190.
131. WINARO, F.G. & STUMBO, C.R. (1971) Mode of action of ethylene oxide on spores of . 36. 892-895.
132. WINGE-HEDEN, K. (1963) Ethylene oxide sterilization without special equipment. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 58. 225-244.

7 . APÊNDICES

Apêndice 1 - Preparo da Amostra-Teste (fita carregadora +
suporte de papel + embalagem de alumínio)



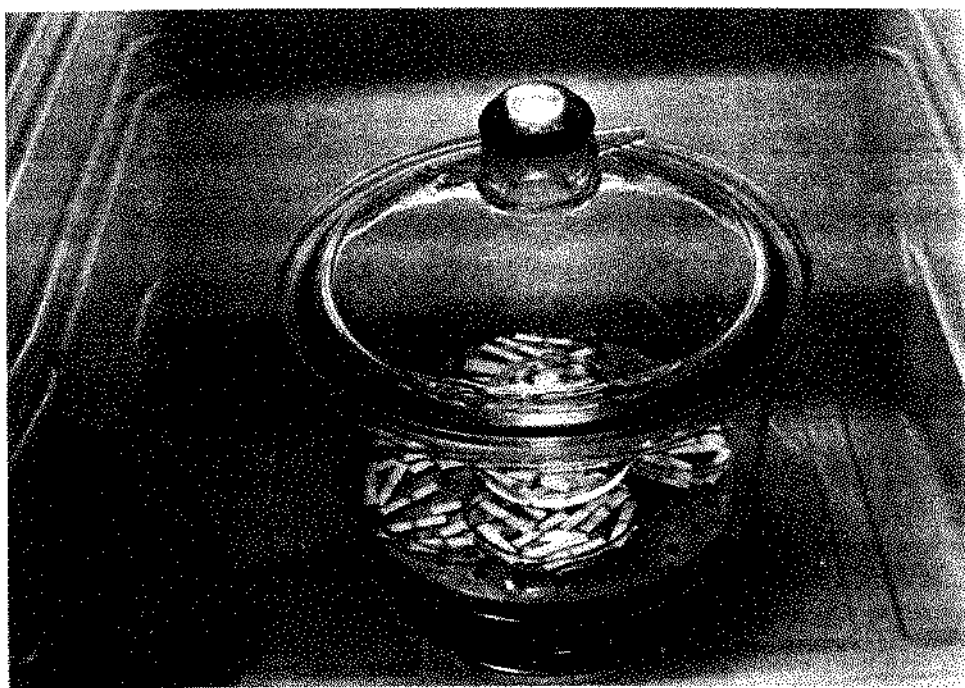
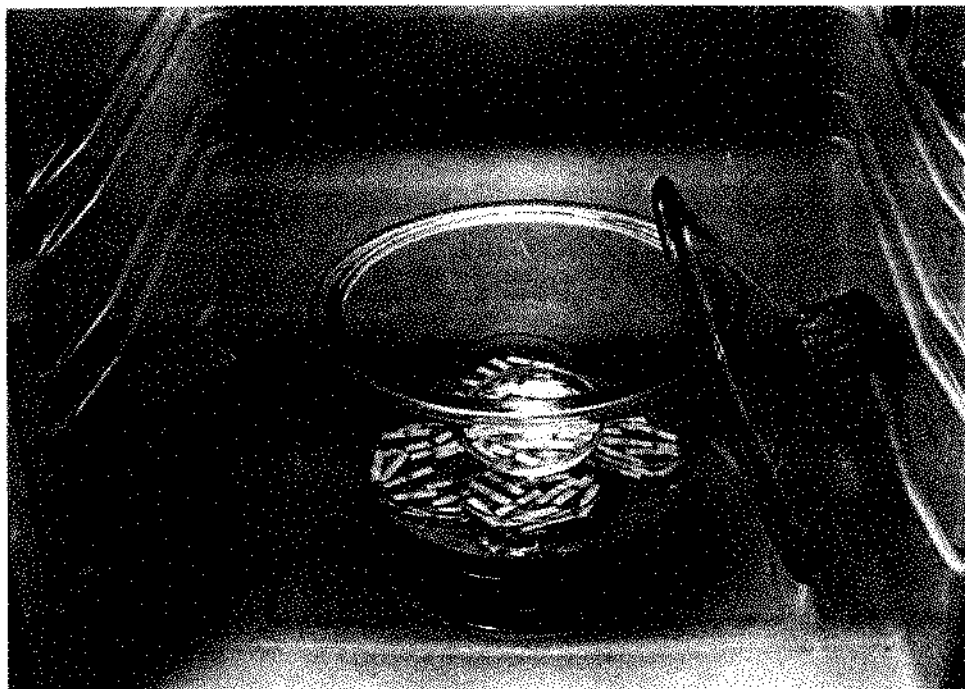
Apêndice 2 - Preparo da Amostra-Teste



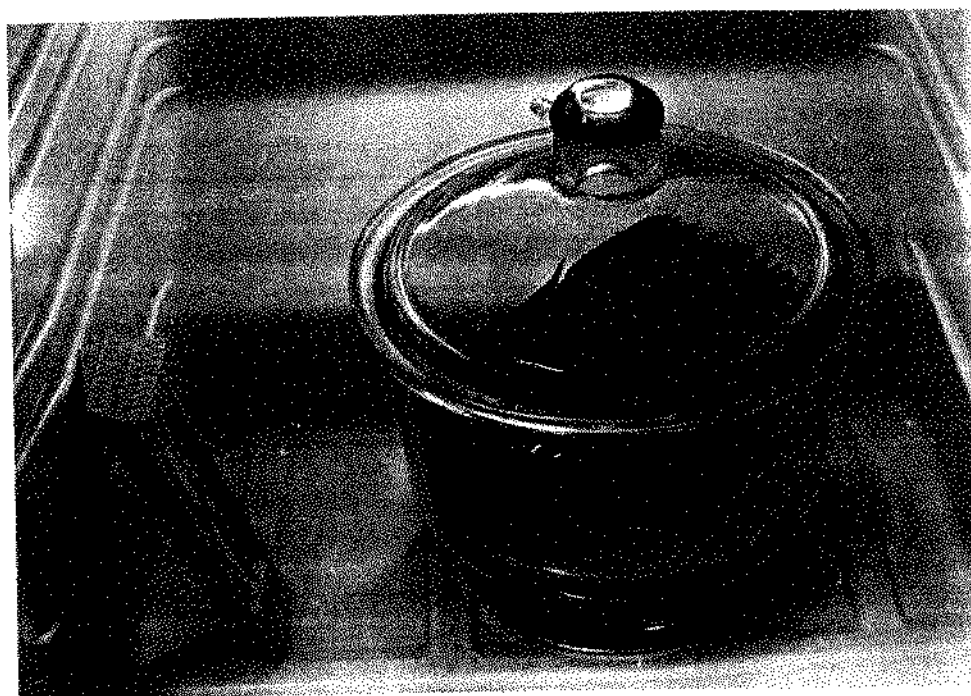
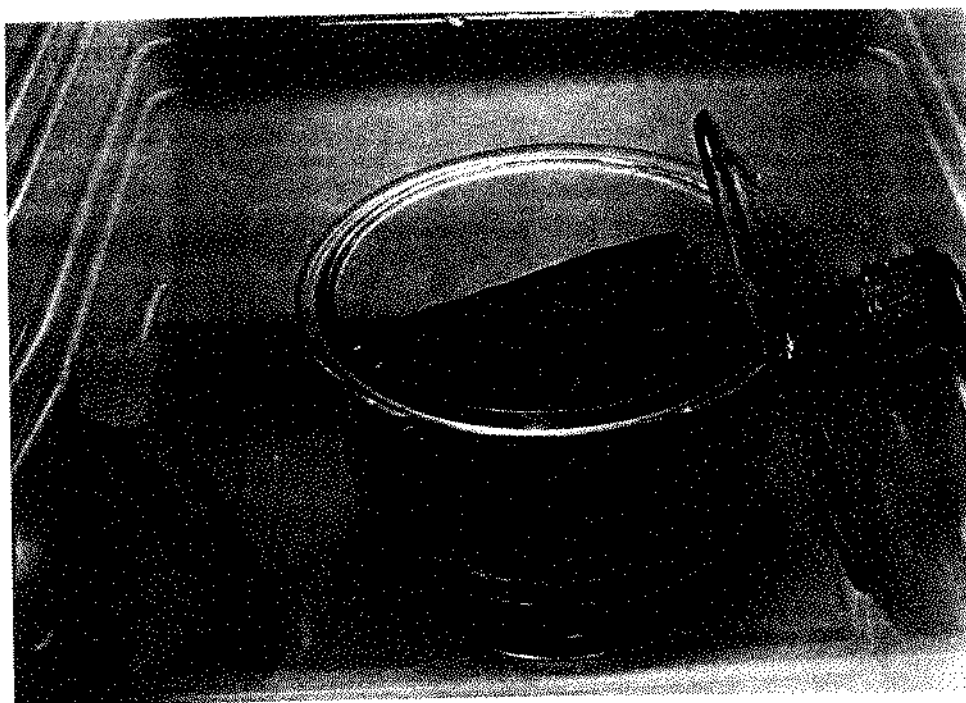
Apêndice 3 - Armazenamento dos IBs (fitas carregadoras) -
sob refrigeração



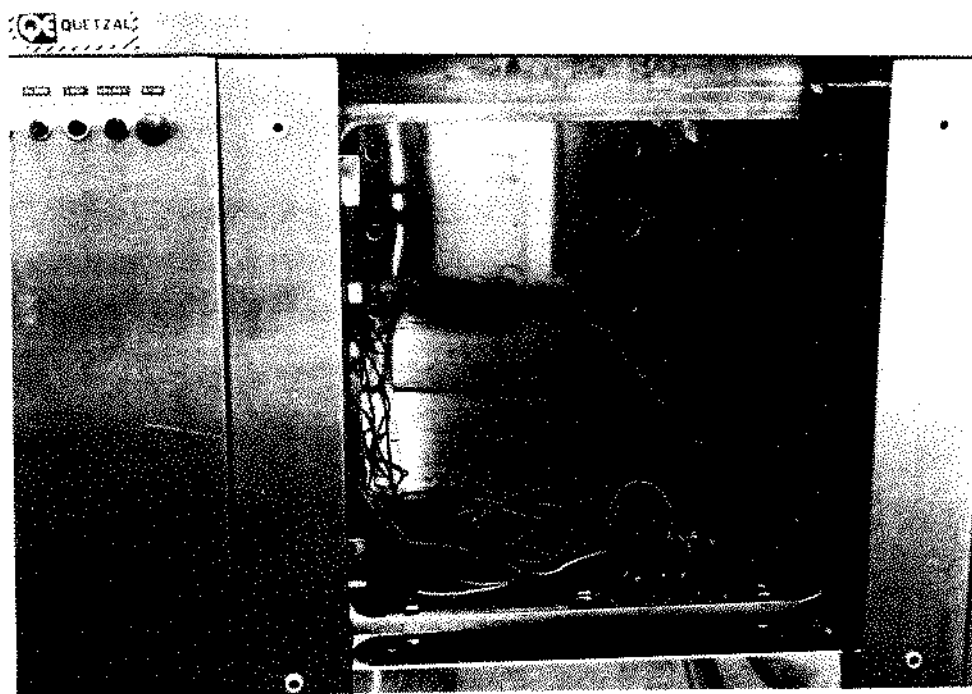
Apêndice 4 - Armazenamento dos IBs (fitas carregadoras) -
sob refrigeração + UR controlada



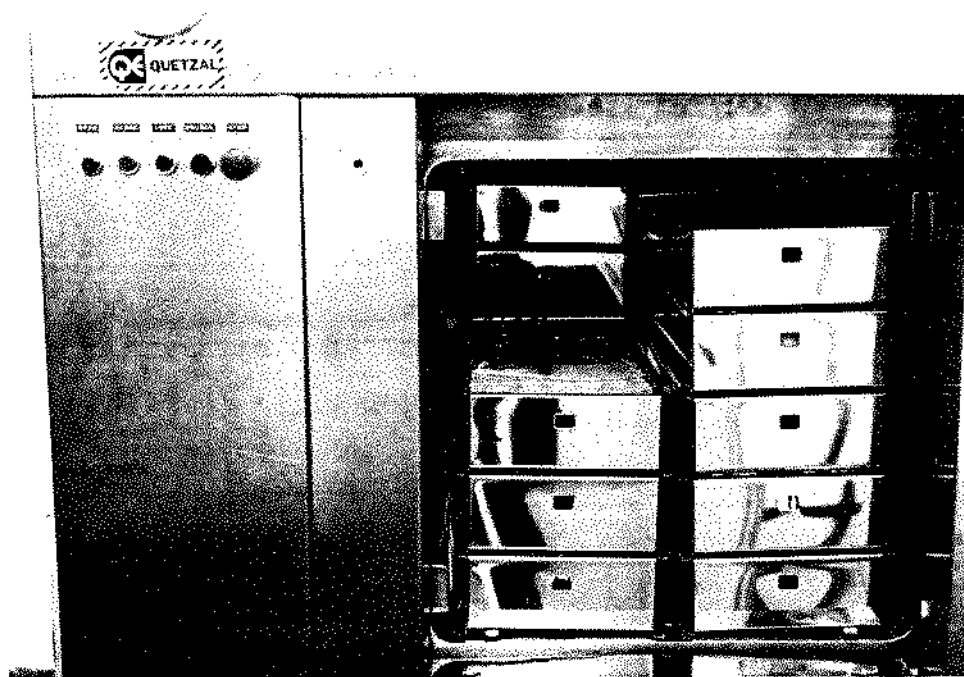
Apêndice 5 - Armazenamento da Amostra-Teste - sob refrigeração
+ UR controlada



Apêndice 6 - Esterilizador por Óxido de Etileno



Apêndice 7 - Posicionamento das Amostras-Testes na Carga de Esterilização



Apêndice 8 - Carga de Esterilização



**APÊNDICE 9. Avaliação Estatística
dos Resultados de
Resistência dos IBs**

DS: A1 x A2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	13.60013770	13.60013770	0.58	<u>0.4576</u>
Error	18	424.77880040	23.59882224		
Corrected Total	19	438.37893810			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.031024	25.14318	4.857862	19.3207920

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	13.60013770	13.60013770	0.58	0.4576

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	13.60013770	13.60013770	0.58	0.4576

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= 23.59882
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 9.1

Number of Means 2
 Critical Range 4.777

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ARMAZEN
<u>A</u>	19.926	13	2
<u>A</u>			
<u>A</u>	18.197	7	1

Dh: A1 x A2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	14.14208609	14.14208609	0.65	<u>0.4318</u>
Error	18	393.56609510	21.86478306		
Corrected Total	19	407.70818119			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.034687	23.83124	4.675979	19.6212195

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	14.14208609	14.14208609	0.65	0.4318

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	14.14208609	14.14208609	0.65	0.4318

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 18 MSE= 21.86478
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 9.1

Number of Means 2
 Critical Range 4.598

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ARMAZEN
<u>A</u>	20.238	13	2
<u>A</u>			
<u>A</u>	18.475	7	1

Ds: B1 x B2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.54682790	0.54682790	0.13	<u>0.7263</u>
Error	6	24.37670517	4.06278419		
Corrected Total	7	24.92353307			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.021940	12.19229	2.015635	16.5320500

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	0.54682790	0.54682790	0.13	0.7263

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	0.54682790	0.54682790	0.13	0.7263

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 4.062784

Number of Means 2
Critical Range 3.488

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ARMAZEN
<u>A</u>	16.793	4	2
<u>A</u>	16.271	4	1

Dh: B1 x B2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.32869021	0.32869021	0.12	<u>0.7416</u>
Error	6	16.53284196	2.75547366		
Corrected Total	7	16.86153217			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.019493	9.753581	1.659962	17.0190000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	0.32869021	0.32869021	0.12	0.7416

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	0.32869021	0.32869021	0.12	0.7416

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 2.755474

Number of Means 2
Critical Range 2.872

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ARMAZEN
<u>A</u>	17.222	4	2
<u>A</u>	16.816	4	1

Ds: C1 x C2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	7.50835215	7.50835215	0.30	<u>0.5887</u>
Error	24	599.83131330	24.99297139		
Corrected Total	25	607.33966545			
R-Square C.V. Root MSE RESIST Mean					
		0.012363	18.96032	4.999297	26.3671608

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	7.50835215	7.50835215	0.30	0.5887
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	7.50835215	7.50835215	0.30	0.5887

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 24.99297
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 11.76923

Number of Means 2
 Critical Range 4.249

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ARMAZEN
<u>A</u>	26.758	17	2
<u>A</u>	25.629	9	1

Dh: C1 x C2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	5.28733516	5.28733516	0.21	<u>0.6482</u>
Error	24	594.41132591	24.76713858		
Corrected Total	25	599.69866107			
R-Square		C.V.	Root MSE	RESIST Mean	
0.008817		18.55967	4.976659	26.8143696	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	5.28733516	5.28733516	0.21	0.6482
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ARMAZEN	1	5.28733516	5.28733516	0.21	0.6482

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 24.76714
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 11.76923

Number of Means 2
 Critical Range 4.230

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	ARMAZEN
<u>A</u>	27.142	17	2
<u>A</u>	26.195	9	1

C2 : Ds x Dh

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1.25546967	1.25546967	0.04	<u>0.8421</u>
Error	32	995.82032776	31.11938524		
Corrected Total	33	997.07579743			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.001259	20.69910	5.578475	26.9503262

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	1.25546967	1.25546967	0.04	0.8421
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	1.25546967	1.25546967	0.04	0.8421

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

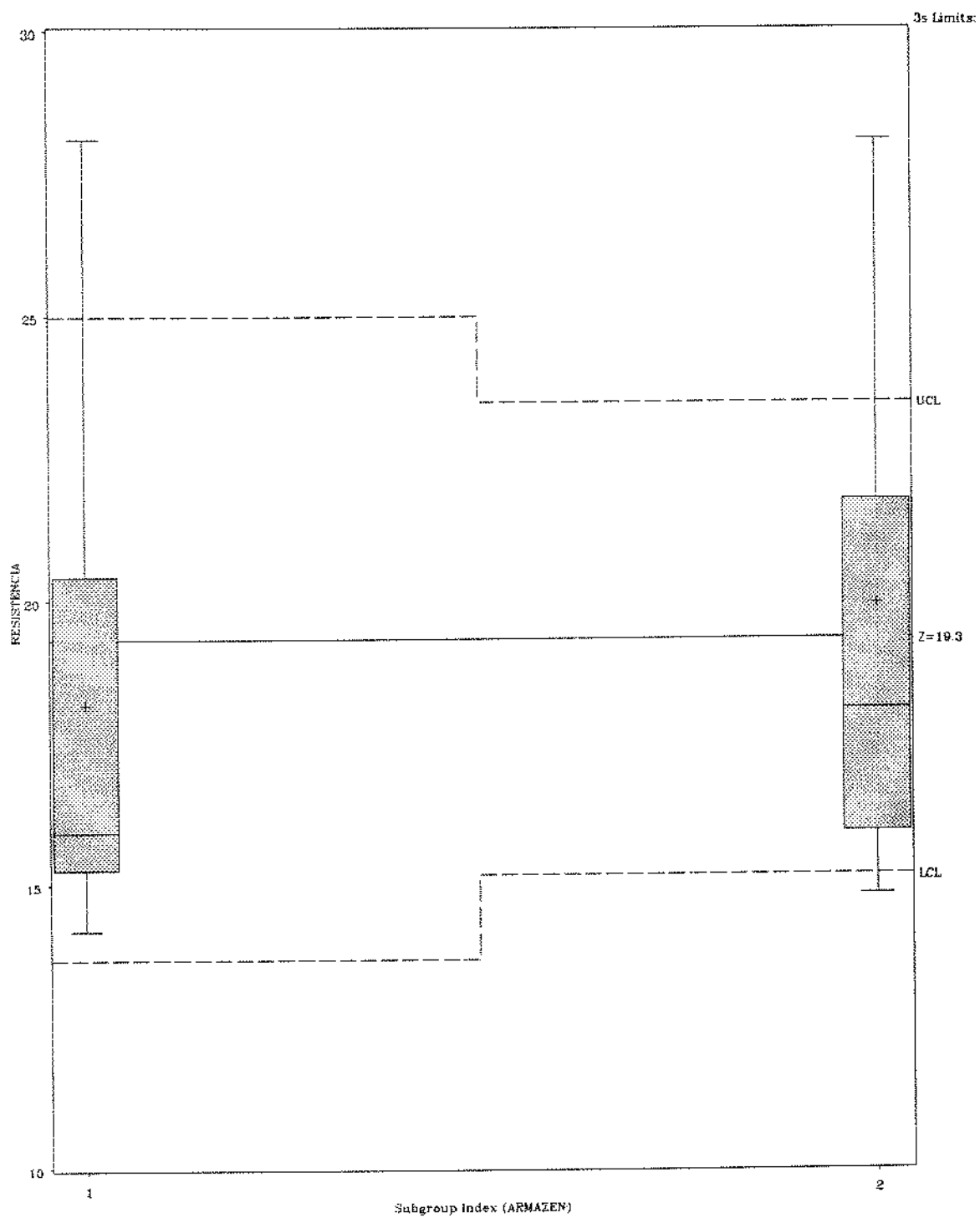
Alpha= 0.05 df= 32 MSE= 31.11939

Number of Means 2
Critical Range 3.896

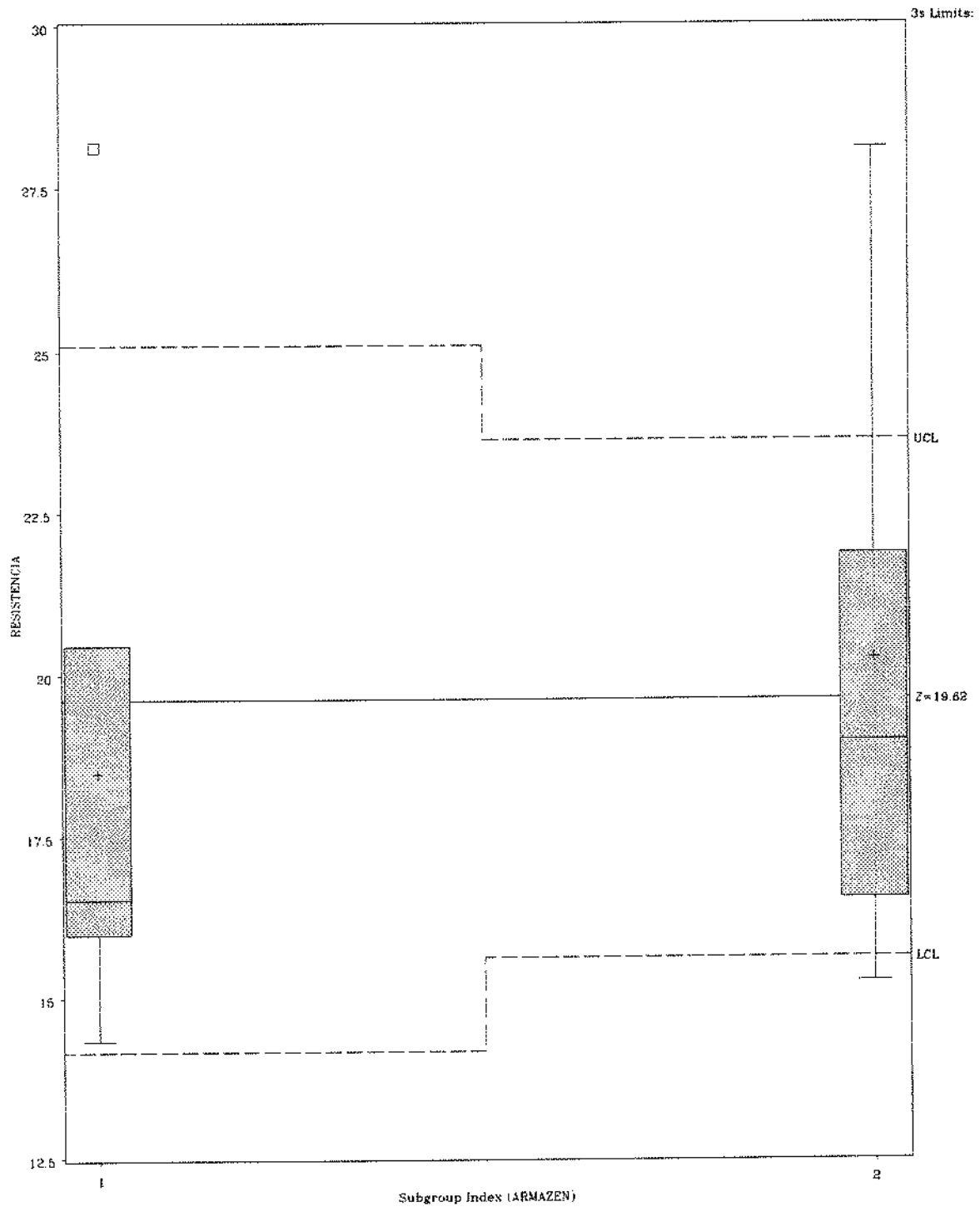
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CALCULO
<u>A</u>	27.142	17	DH
<u>A</u>	26.758	17	DS

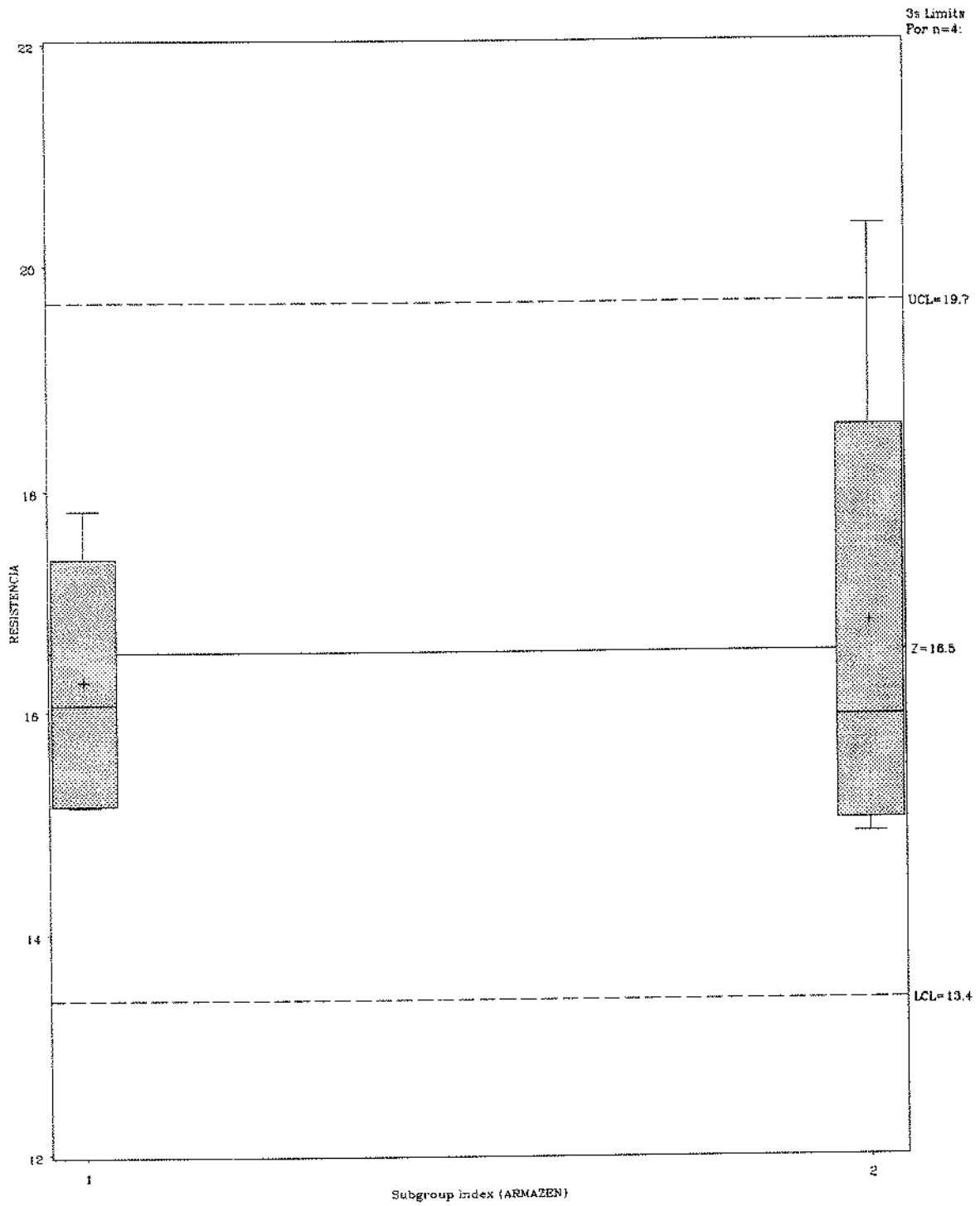
RESISTENCIA Ds: A1 x A2



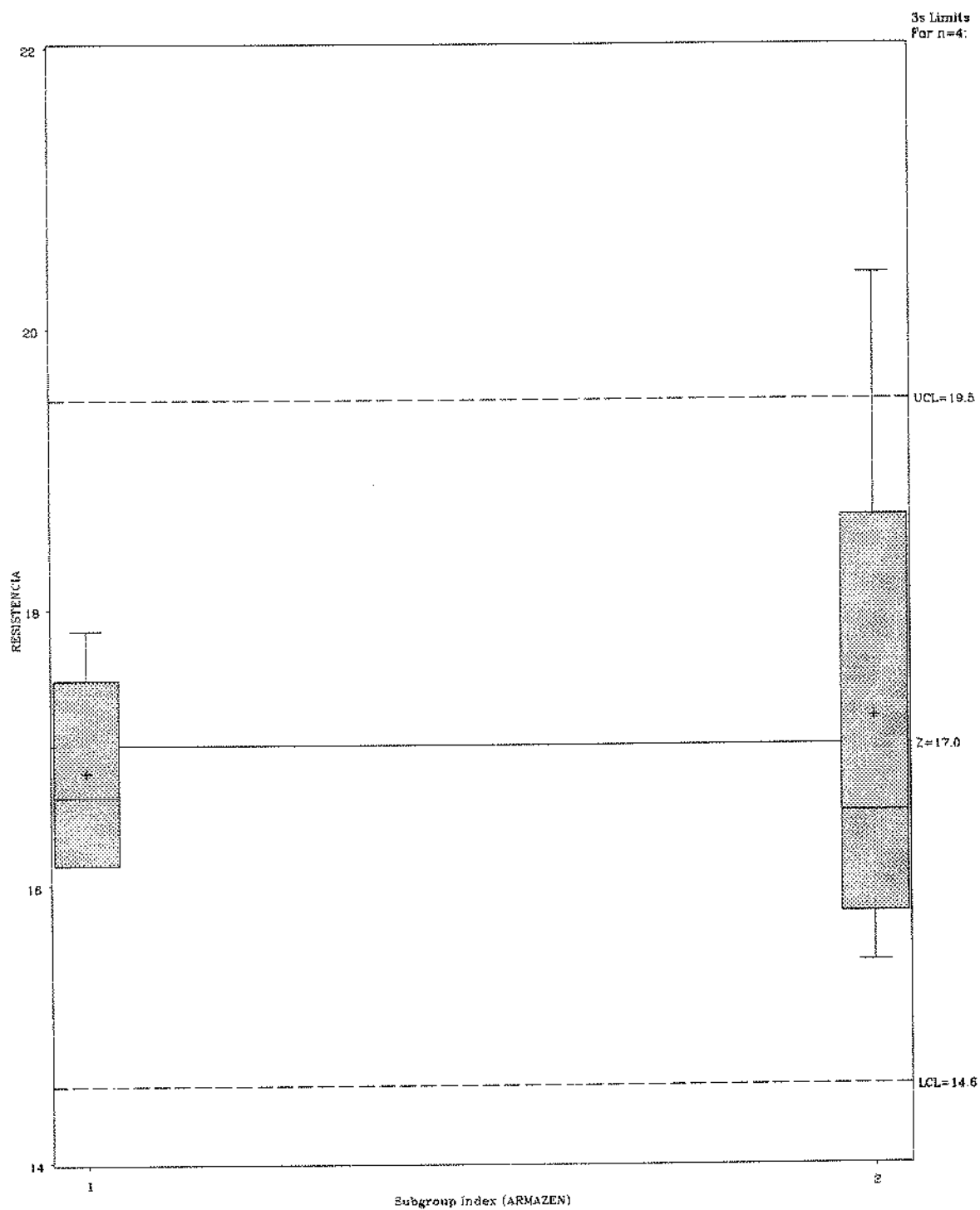
RESISTENCIA Dh: A1 x A2



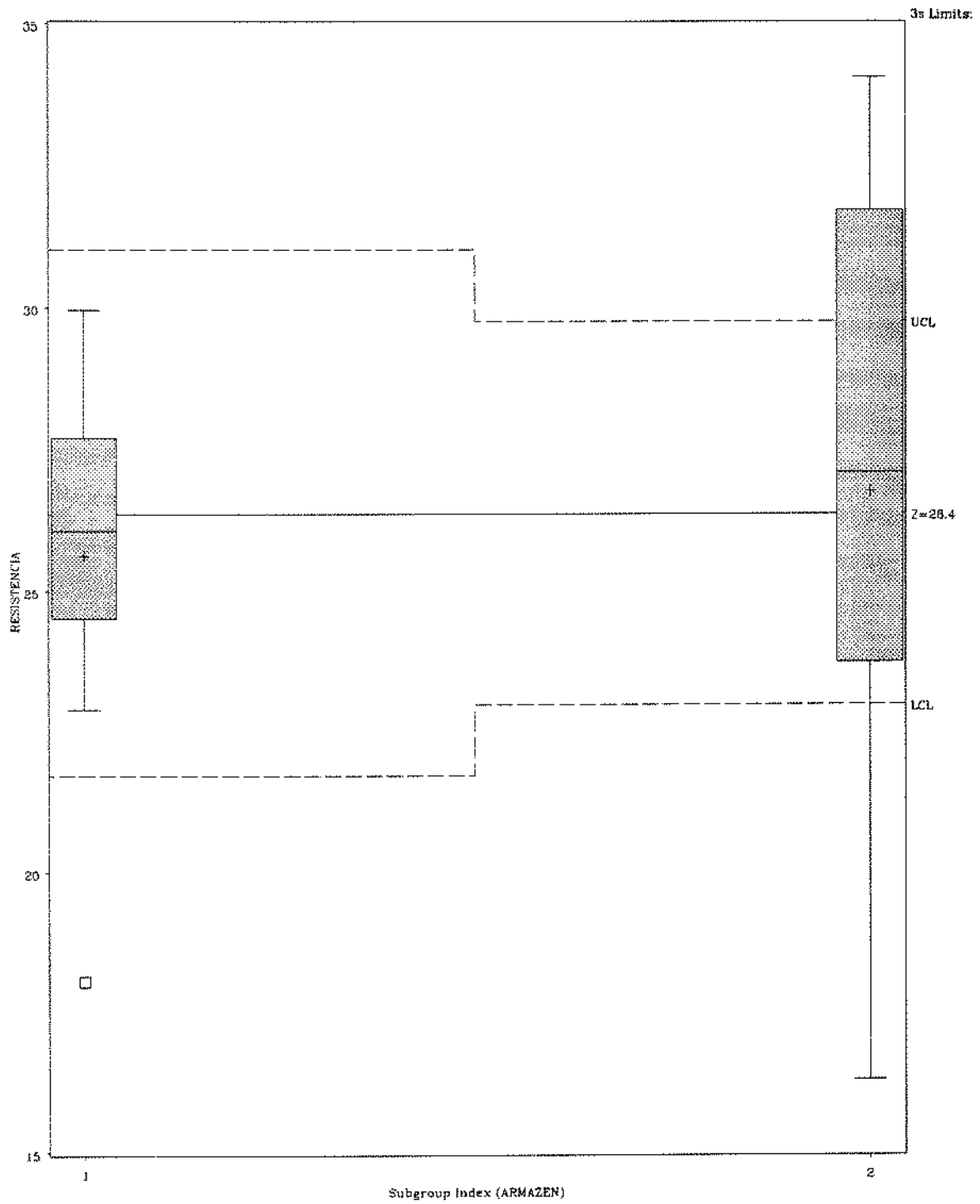
RESISTENCIA Ds: B1 x B2



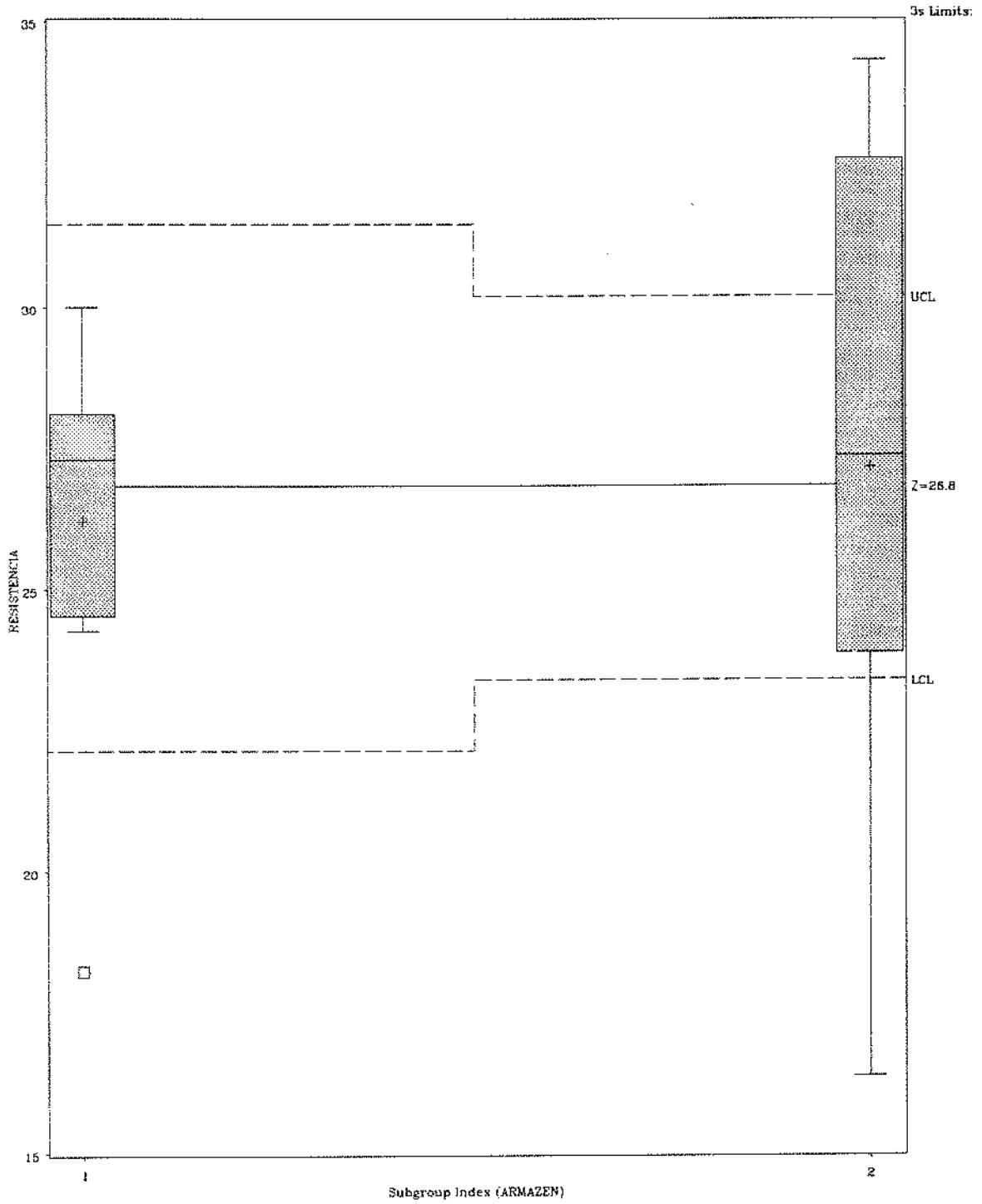
RESISTENCIA Dh: B1 x B2



RESISTENCIA Ds: C1 x C2



RESISTENCIA Dh: C1 x C2



Ds: A1 x B1 x C1

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	336.7943930	168.3971965	11.78	<u>0.0006</u>
Error	17	242.9849219	14.2932307		
Corrected Total	19	579.7793150			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.580901	17.87034	3.780639	21.1559450

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	336.7943930	168.3971965	11.78	0.0006
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	336.7943930	168.3971965	11.78	0.0006

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 17 MSE= 14.29323
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 5.952756

Number of Means 2 3
 Critical Range 4.616 4.845

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	METODO
<u>A</u>	25.629	9	C
<u>B</u>	18.197	7	A
<u>B</u>			
<u>B</u>	16.271	4	B

Dh: A1 x B1 x C1

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	349.8691780	174.9345890	12.82	<u>0.0004</u>
Error	17	231.9718565	13.6454033		
Corrected Total	19	581.8410345			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.601314	17.08812	3.693969	21.6171730

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	349.8691780	174.9345890	12.82	0.0004
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	349.8691780	174.9345890	12.82	0.0004

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 17 MSE= 13.6454
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 5.952756

Number of Means 2 3
 Critical Range 4.510 4.734

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	METODO
<u>A</u>	26.195	9	C
<u>B</u>	18.475	7	A
<u>B</u>			
<u>B</u>	16.816	4	B

DS: A2 x B2 x C2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	517.0148095	258.5074047	9.94	<u>0.0005</u>
Error	31	806.0018969	26.0000612		
Corrected Total	33	1323.0167064			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.390785	22.19523	5.099026	22.9735153

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	517.0148095	258.5074047	9.94	0.0005

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	517.0148095	258.5074047	9.94	0.0005

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 31 MSE= 26.00006

WARNING: Cell sizes are not equal.

Harmonic Mean of cell sizes= 7.777126

Number of Means	2	3
Critical Range	5.271	5.540

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	METODO
<u>A</u>	26.758	17	C
<u>B</u>	19.926	13	A
<u>B</u>			
<u>B</u>	16.793	4	B

Dh: A2 x B2 x C2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	520.6048294	260.3024147	10.45	<u>0.0003</u>
Error	31	772.5384064	24.9205938		
Corrected Total	33	1293.1432358			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.402589	21.39254	4.992053	23.3354865

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	520.6048294	260.3024147	10.45	0.0003

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
METODO	2	520.6048294	260.3024147	10.45	0.0003

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

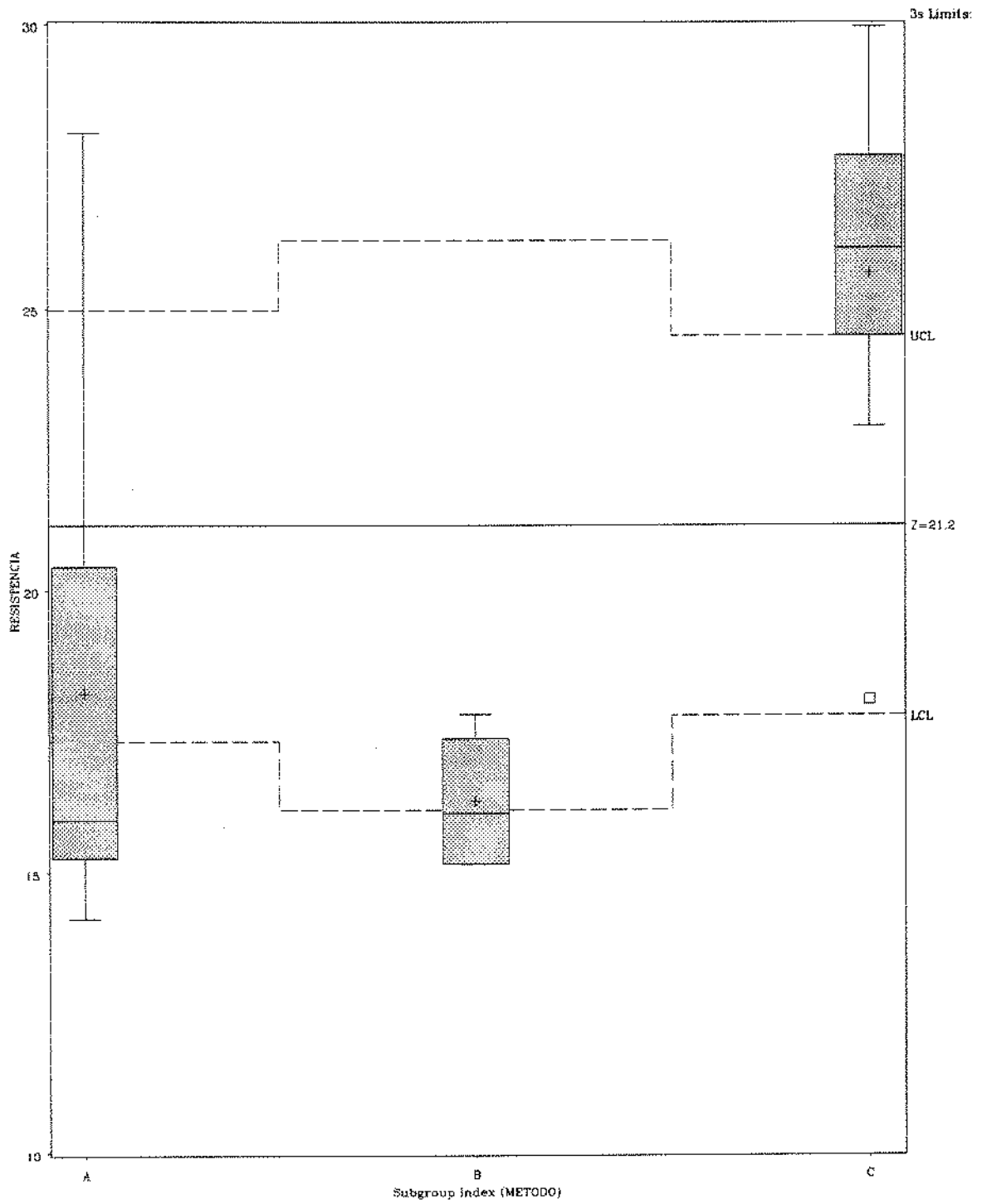
Alpha= 0.05 df= 31 MSE= 24.92059
 WARNING: Cell sizes are not equal.
 Harmonic Mean of cell sizes= 7.777126

Number of Means 2 3
 Critical Range 5.161 5.424

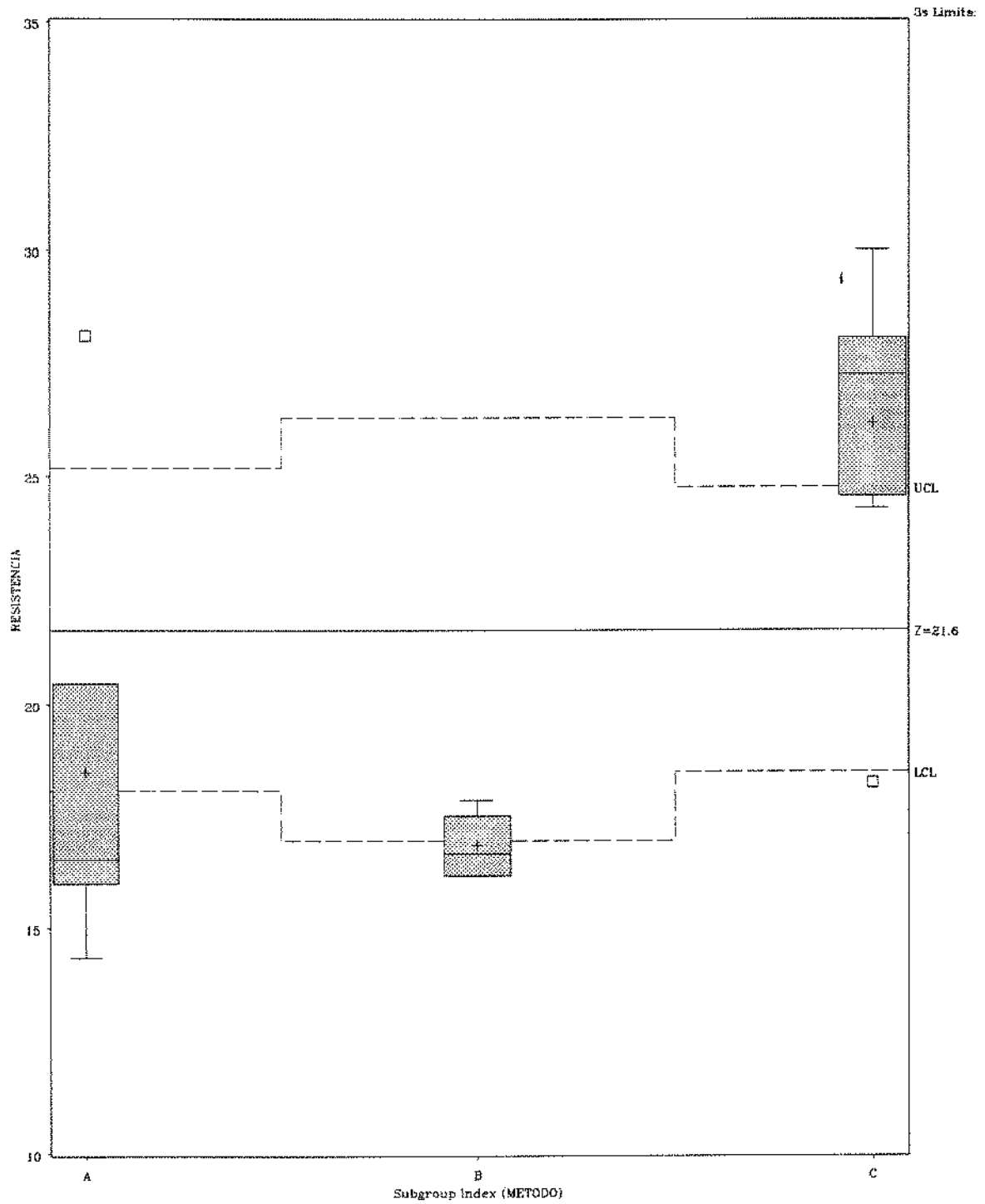
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	METODO
<u>A</u>	27.142	17	C
<u>B</u>	20.238	13	A
<u>B</u>			
<u>B</u>	17.222	4	B

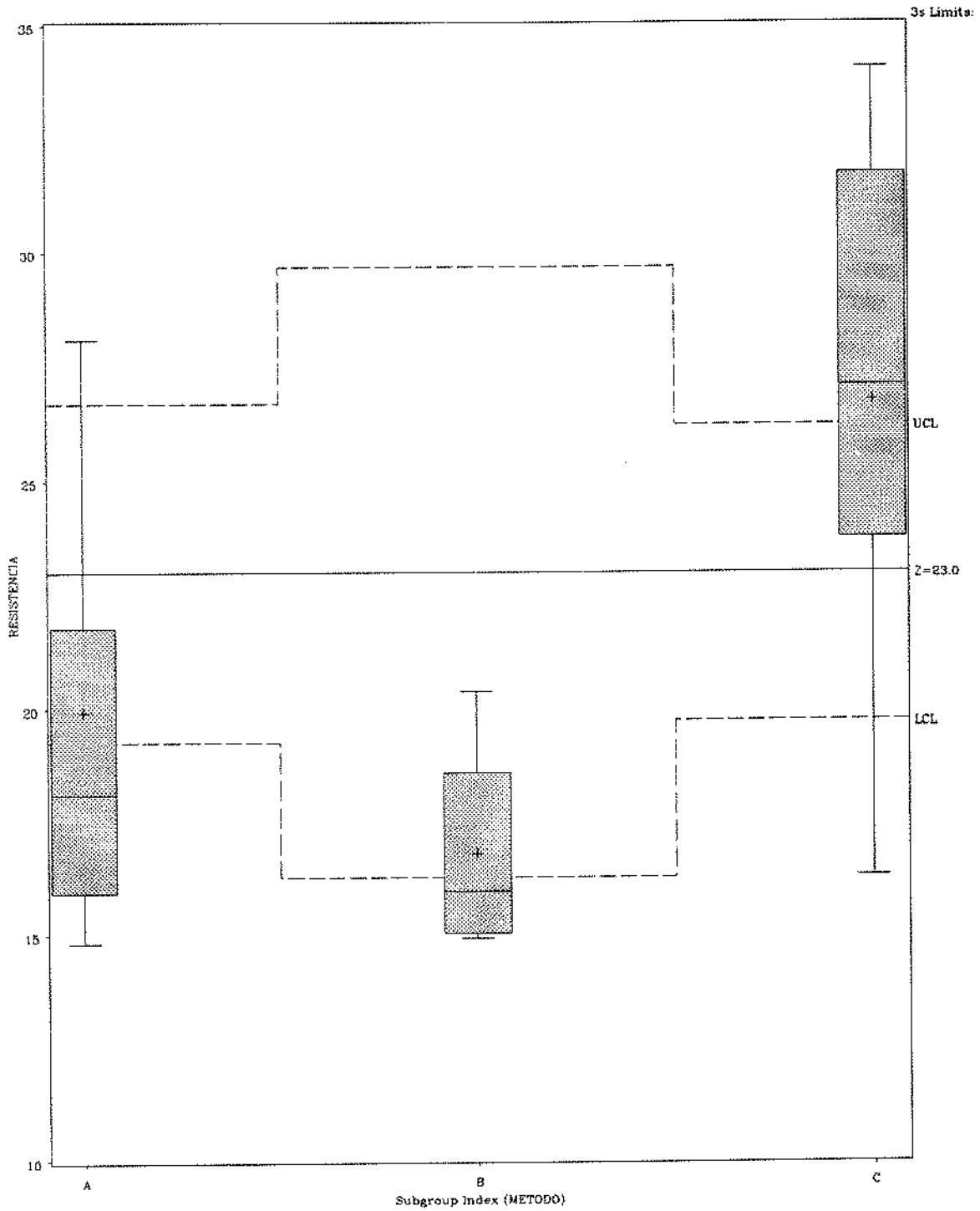
RESISTENCIA Ds: A1 x B1 x C1



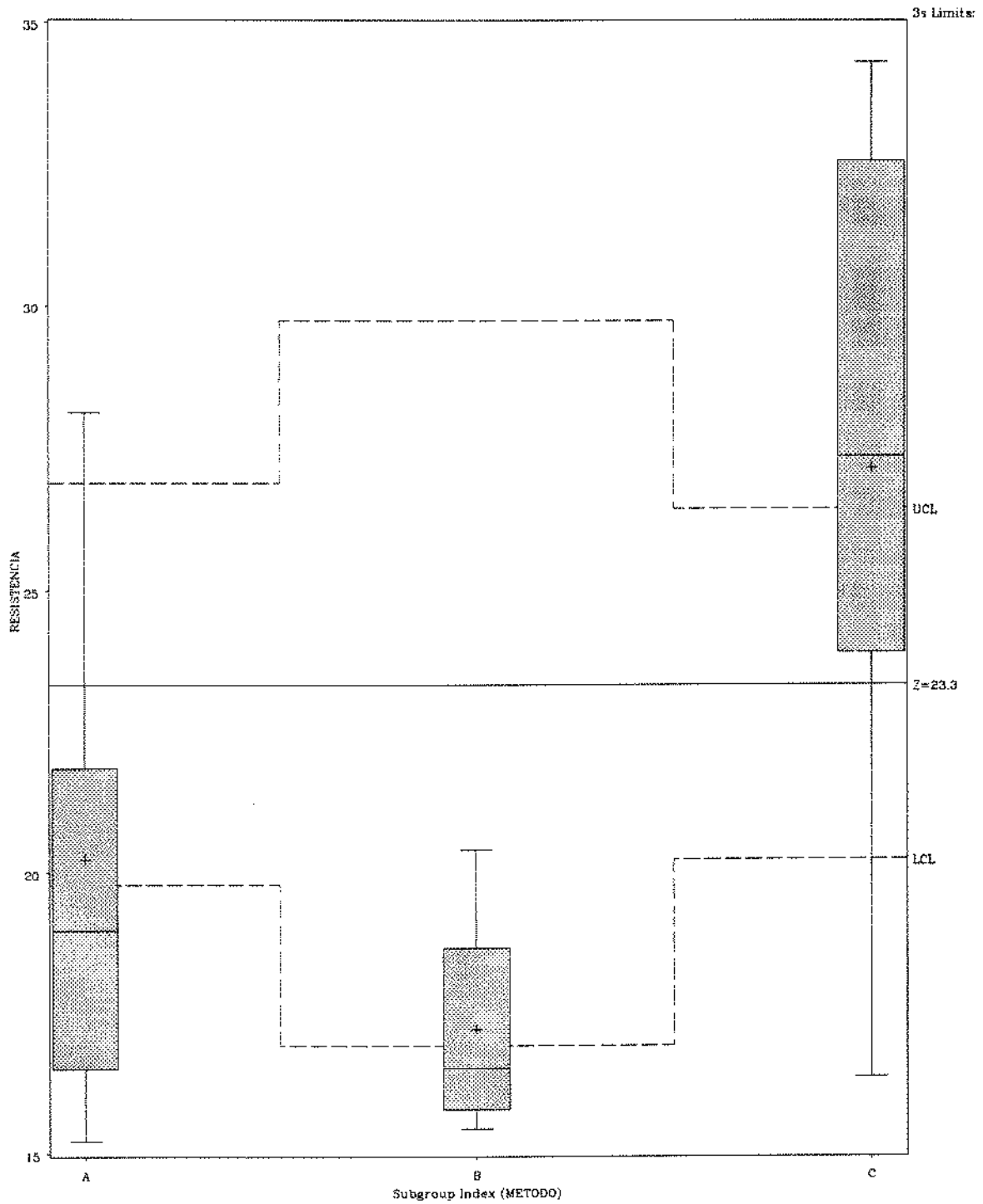
RESISTENCIA Dh: A1 x B1 x C1



RESISTENCIA Ds: A2 x B2 x C2



RESISTENCIA Dh: A2 x B2 x C2



A1 : Ds x Dh

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.27099185	0.27099185	0.01	<u>0.9143</u>
Error	12	269.13918236	22.42826520		
Corrected Total	13	269.41017421			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.001006	25.82794	4.735849	18.3361450

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.27099185	0.27099185	0.01	0.9143

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.27099185	0.27099185	0.01	0.9143

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 12 MSE= 22.42827

Number of Means 2
Critical Range 5.505

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CALCULO
<u>A</u>	18.475	7	DH
<u>A</u>	18.197	7	DS

A2 : Ds x Dh

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.63422199	0.63422199	0.03	<u>0.8692</u>
Error	24	549.20571314	22.88357138		
Corrected Total	25	549.83993513			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.001153	23.82062	4.783678	20.0820846

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.63422199	0.63422199	0.03	0.8692

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.63422199	0.63422199	0.03	0.8692

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 22.88357

Number of Means 2
Critical Range 3.869

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CALCULO
<u>A</u>	20.238	13	DH
<u>A</u>	19.926	13	DS

B1 : Ds x Dh

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.59557152	0.59557152	0.48	<u>0.5130</u>
Error	6	7.39528464	1.23254744		
Corrected Total	7	7.99085616			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.074532	6.710821	1.110202	16.5434538

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.59557152	0.59557152	0.48	0.5130
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.59557152	0.59557152	0.48	0.5130

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 1.232547

Number of Means 2
Critical Range 1.921

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CALCULO
<u>A</u>	16.816	4	DH
<u>A</u>	16.271	4	DS

B2 : Ds x Dh

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.36671476	0.36671476	0.07	<u>0.8063</u>
Error	6	33.51426249	5.58571042		
Corrected Total	7	33.88097726			

R-Square	C.V.	Root MSE	RESIST Mean
0.010824	13.89621	2.363411	17.0075962

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.36671476	0.36671476	0.07	0.8063
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	0.36671476	0.36671476	0.07	0.8063

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 5.58571

Number of Means 2
Critical Range 4.089

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CALCULO
<u>A</u>	17.222	4	DH
<u>A</u>	16.793	4	DS

C1 : Ds x Dh

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: RESIST

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1.44159068	1.44159068	0.12	<u>0.7376</u>
Error	16	198.42231146	12.40139447		
Corrected Total	17	199.86390214			
R-Square		C.V.	Root MSE	RESIST Mean	
0.007213		13.59068	3.521561	25.9115944	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	1.44159068	1.44159068	0.12	0.7376
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CALCULO	1	1.44159068	1.44159068	0.12	0.7376

Duncan's Multiple Range Test for variable: RESIST

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 16 MSE= 12.40139

Number of Means 2
Critical Range 3.513

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	CALCULO
<u>A</u>	26.195	9	DH
<u>A</u>	25.629	9	DS