



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ACTIVIDADE BIOCIDA DO ÓXIDO DE  
ETILENO EM DISPOSITIVOS MÉDICOS**

**Ana Ernestina Silveira Nunes**

**Outubro de 2010**



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

# **ACTIVIDADE BIOCIDA DO ÓXIDO DE ETILENO EM DISPOSITIVOS MÉDICOS**

**Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica**

**Ana Ernestina Silveira Nunes**

Orientador: Prof. Doutor António Paulo Teixeira  
Co-orientadora: Prof. Doutora Ana Teresa Palma

**Outubro de 2010**

**Aos meus sobrinhos António e Caetana**

“O verdadeiro heroísmo consiste em persistir  
por mais um momento quando tudo parece perdido”.

W.F.Grenfel

Ana Silveira Nunes (2010). Actividade Biocida do Óxido de Etileno em Dispositivos Médicos. Dissertação de Mestrado (A. Teixeira e A. Palma, orientadores), Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

## RESUMO

Os dispositivos médicos assumem uma grande importância na medicina actual. No entanto, muitos dos materiais destes dispositivos não podem ser submetidos a processos de esterilização que utilizem temperaturas elevadas, pois deformam-se ou degradam-se, impedindo assim a sua posterior utilização.

A esterilização por óxido de etileno é um tipo de esterilização química baseada na utilização deste composto como agente esterilizante, sendo o método recomendado para os dispositivos que não podem ser esterilizados através das técnicas tradicionais de calor e/ou vapor, incluindo artigos termossensíveis e em embalagem final.

Tendo em vista a implementação de uma central de esterilização de dispositivos médicos por óxido de etileno, desenvolveu-se este estudo com o objectivo de estudar os factores que contribuem para a contaminação dos dispositivos médicos, nomeadamente: manipuladores, ar, superfícies, matéria-prima, e avaliar as condições microbiológicas em que se encontram após a sua embalagem, bem como a actividade biocida do óxido de etileno em diversos dispositivos médicos contaminados com carga microbiana conhecida.

Os resultados obtidos mostraram uma variação da carga contaminante influenciada por diversos factores, nomeadamente durante a produção, em períodos de calor e em superfícies em que mais difícil efectuar a sua higienização, o que obriga à imposição de regras de higiene adequadas de modo a reduzir os valores.

Foi avaliada a carga microbiana de diversos dispositivos médicos a qual mostrou que os dispositivos em gaze e não tecido apresentam uma maior carga microbiana que os materiais de plástico e metal. A proliferação ao longo de um período de tempo de armazenamento foi também avaliada.

No estudo efectuado comprovou-se que o óxido de etileno é eficaz na esterilização dos diversos dispositivos embalados até uma carga microbiana de  $10^6$  ufc/g.

Verificou-se também que o método enzimático é sensível a valores de carga microbiana de  $10^7$  ufc/g.

Palavras-chave: Esterilização, óxido de etileno, dispositivos médicos, segurança, desinfecção

Ana Silveira Nunes (2010). Biocidal Activity of Ethylene Oxide in Medical Devices. Dissertação de Mestrado (A. Teixeira e A. Palma, orientadores), Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

## **ABSTRACT**

Medical devices have great importance in modern medicine. However many of these medical devices materials cannot be submitted to sterilization processes that use high temperatures, because they can be deformed or degraded, thus preventing there further use.

Sterilization by ethylene oxide is a type of chemistry sterilization process based on the use of this reagent, which is the recommended method for devices that cannot be sterilized by traditional techniques of heat and / or steam, including thermo sensitive medical devices and articles in the final package.

In order to implement a central sterilization unit of medical devices by ethylene oxide, this study was carried out to study the factors that contribute to the contamination of medical devices, including: handlers, air, surfaces, raw materials and the microbiological conditions in which they are after packaging. Additionally the biocidal activity of ethylene oxide was evaluated in various medical devices contaminated with known microbial load.

The results showed a variation of the microbial load, influenced by several factors, namely during the production, in warmer weather, and in areas where was more difficult to carry out their cleaning, which requires the imposition of rules of proper hygiene to reduce these values.

It was also evaluated the microbial load of several medical devices, which showed that the devices in gauze and nonwoven have a higher microbial load than the plastic materials and metal. The proliferation over a period storage time was also evaluated.

In the study it was shown that ethylene oxide is effective in sterilization of various devices packed into a microbial load of  $10^6$  ufc/g.

It was also found that the enzymatic method is sensitive to values of microbial load of  $10^7$  ufc/g.

Keywords: Sterilization, ethylene oxide, medical devices, safety, disinfection.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Manela e José, pelo apoio em mais uma etapa da minha vida.

Ao Paulo, o meu namorado, pelo carinho e paciência.

À Medirm, em especial à Dr.<sup>a</sup> Liliana Júlio e Dr. Hélio Júlio, pela oportunidade e viabilização do estudo, e pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Doutor António Teixeira e à Prof. Doutora Ana Teresa, os meus agradecimentos pelo precioso auxílio e acompanhamento prestados e pela disponibilidade constante que sempre demonstraram ao longo de todo o trabalho.

À Senhora Enfermeira Helena Festas do Hospital Pedro Hispano, que tornou possível a visita ao Centro de Esterilização.

À Eng.<sup>a</sup> Céu Serralheiro, às auxiliares do laboratório, D. Helena Carvalho e D. Esperança Alves, pela amizade e auxílio no trabalho realizado em laboratório.

Agradeço também a todos os colegas e professores do mestrado, especialmente ao Prof. Doutor Rui Ferreira e à Prof. Doutora Célia Antunes, pela disponibilidade que sempre demonstram e pelo apoio prestado, em diversas ocasiões, ao longo do mestrado.

A todos aqueles que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## SIGLAS E ABREVIATURAS

AL: nível de acção

CE: Conformidade Europeia

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EPI: Equipamento de protecção individual

EPC: Equipamento de protecção colectiva

EL: limite de exposição

FDA: *Food and Drug Administration*

IB: indicador biológico

INT: Cloreto 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio

INTF: Cloreto de iodonitrotetrazolio

MEA: *Malt extract agar*

NAD<sup>+</sup>: Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)

NADP<sup>+</sup>: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)

OE: Óxido de etileno

OHSAS: *Occupational Health and Safety Assessment Specification*

PE: Polietileno

PET: Politereftalato de etileno

PEL: Limite de exposição permitido

PVC: Cloreto de polivinilo

PCA: *plate count agar*

SAL: *Sterility assurance level*

SGC2: *Sabourraud* Gentamicina Cloranfenicol

UFC: Unidades formadoras de colónias

# ÍNDICE

DEDICATÓRIA	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	IV
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII

## Capítulo I - Introdução

1. Dispositivos médicos	2
1.1. Embalagem de dispositivos médicos para esterilização	2
1.2. Esterilização de dispositivos médicos	5
1.2.1. Processos físicos de esterilização	5
1.2.2. Processos químicos de esterilização	6
2 Esterilização por óxido de etileno	7
2.1 Propriedades do óxido de etileno	8
2.2. Mecanismo de ação do óxido de etileno nas células	10
2.3. Esterilização e resistência de formas microbianas	11
2.3.1. Resistência de formas microbianas à exposição ao óxido de etileno	12
2.4. Processo de esterilização	12
2.4.1. Etapas do processo de esterilização	14
2.4.1.1. Pré acondicionamento	14
2.4.1.2. Humidificação	15
2.4.1.3. Esterilização	15
2.4.1.4. Arejamento	16
2.5. Controlo do processo de esterilização	16
2.5.1. Controlos físicos, químicos e microbiológicos	17

2.5.2.	Controlo microbiológico	18
2.5.2.1.	Ensaio de esterilidade	20
2.5.3.	Controlo de manipuladores	23
2.5.4.	Controlo ambiental	25
2.5.5.	Controlo residual do óxido de etileno nos dispositivos médicos e no ambiente	26
2.5.5.1.	Método através de leitura directa	27
2.5.5.2.	Método através de sensores ultra-selectivos	27
2.5.5.3.	Controlo do óxido de etileno residual nos dispositivos médicos	27
2.6.	Indicadores de contaminação microbiológica por marcadores bioquímicos	28
3.	Legislação	29
4.	Instalação de uma central de esterilização	30

## **Capítulo II – Problemática e objectivos**

1.	Problemática	35
2.	Objectivos	36

## **Capítulo III – Parte experimental**

1.	Metodologias utilizadas para determinação da carga microbiana nas etapas de produção	38
1.1.	Determinação da carga microbiana no ar	38
1.2.	Determinação da carga microbiana em superfícies	39
1.3.	Determinação da carga microbiana em manipuladores	39
1.4.	Determinação da carga microbiana em matéria-prima e produto não estéril (produto semi-acabado)	39
2.	Ensaio realizados em condições controladas	40
2.1.	Avaliação da contaminação em <i>Trichoderma reesei</i>	40
2.1.1.	Preparação das culturas e contaminação dos dispositivos médicos com <i>Trichoderma reesei</i>	40

2.1.2.	Avaliação da contaminação dos dispositivos médicos por <i>Trichoderma reesei</i>	41
2.1.2.1.	Compressas de gaze e não tecido	41
2.1.2.2.	Plástico e metal	42
2.2.	Avaliação da contaminação com <i>Escherichia coli</i>	43
2.2.1.	Preparação das culturas e contaminação dos dispositivos médicos com <i>Escherichia coli</i>	43
2.2.2.	Avaliação dos dispositivos médicos por <i>Escherichia coli</i>	44
2.2.2.1.	Compressas de gaze e não tecido	44
2.2.2.2.	Plástico e metal	45
3.	Avaliação da contaminação microbiana ao longo do tempo de armazenamento	46
4.	Ensaio de esterilidade	47
5.	Ensaio enzimáticos	47
6.	Validação estatística dos resultados	48

#### **Capítulo IV – Resultados e Discussão**

4.1.	Carga microbiana existente no ar	50
4.2.	Carga microbiana existente nas superfícies	53
4.3.	Contaminação existente nos manipuladores	54
4.4.	Carga microbiana existente na matéria-prima	56
4.5.	Carga microbiana existente no produto não estéril (produto semi-acabado)	58
4.6.	Proliferação de <i>Trichoderma reesei</i> ao longo do armazenamento	61
4.7.	Proliferação da <i>Escherichia coli</i> ao longo do armazenamento	64
4.8.	Evolução da carga microbiana ao longo do armazenamento	67
4.9.	Carga microbiana após esterilização com óxido de etileno	69
4.10.	Avaliação da contaminação microbiana utilizando o método enzimático da desidrogenase	71

<b>Capítulo V – Conclusões</b>	<b>72</b>
--------------------------------	-----------

## Capítulo VI - Bibliografia

### Anexos

- Anexo 1.** Tratamento estatístico dos resultados da contaminação por *Trichoderma reesei* 82
- Anexo 2.** Tratamento estatístico dos resultados da contaminação por *Escherichia coli* 84
- Anexo 3.** Tratamento estatístico dos resultados da contaminação ao longo do tempo de armazenamento 86

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Equipamento de termoformação de filmes	4
Figura 2.	Etapas de termoformação do filme	4
Figura 3.	Estrutura química do óxido de etileno	8
Figura 4.	Cilindro de óxido de etileno numa câmara de esterilização a nível hospitalar	13
Figura 5.	Configuração da carga em paletes	15
Figura 6.	Indicador químico do processo de esterilização	17
Figura 7.	Indicador com integrador	18
Figura 8.	Indicador biológico para óxido de etileno	19
Figura 9.	Indicadores biológicos distribuídos na unidade de carga, do produto seleccionado	19
Figura 10.	Estufa para incubação dos indicadores biológicos utilizados no processo de esterilização por óxido de etileno	20
Figura 11.	Reacção enzimática entre o INT e a desidrogenase	29
Figura 12.	Aparelho para recolha de amostra de ar	38
Figura 13.	Esquema de preparação das soluções para contaminação	41
Figura 14.	Metodologia utilizada para análise das compressas de gaze e não tecido	42
Figura 15.	Metodologia utilizada para avaliação dos dispositivos médicos em plástico e metal contaminados com <i>Trichoderma reesei</i>	43
Figura 16.	Preparação das suspensões de <i>Escherichia coli</i> com diferentes concentrações	44
Figura 17.	Metodologia utilizada para avaliação dos dispositivos médicos em gaze e não tecido contaminados com <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 18.	Metodologia utilizada para avaliação dos dispositivos médicos em plástico e metal contaminados com <i>Escherichia coli</i>	46
Figura 19.	Zonas afectas à área de produção	50
Figura 20.	Valores médios de contaminação microbiana do ar em períodos de produção e em ausência de produção	52

Figura 21.	Valores médios de contaminação microbiana em superfícies	54
Figura 22.	Valores médios de ufc/manipuladores de microrganismos a 30°C	55
Figura 23.	Matéria-prima analisada	56
Figura 24.	Valores médios de contaminação microbiana na matéria-prima nos diferentes materiais	58
Figura 25.	<i>Kit</i> mais manipulado	59
Figura 26.	<i>Kit</i> rígido	59
Figura 27.	Valores médios de contaminação de produto semi-acabado	61
Figura 28.	Colónia de <i>Trichoderma reesei</i>	61
Figura 29.	Valores médios da proliferação de <i>Trichoderma reesei</i> , em ufc/g de material	62
Figura 30.	Valores médios de crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> em gaze	63
Figura 31.	Valores médios de crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> em não tecido	63
Figura 32.	Valores médios de crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> em plástico	64
Figura 33.	Valores médios de crescimento de <i>Trichoderma reesei</i> em metal	64
Figura 34.	Valores médios da proliferação de <i>Escherichia coli</i> , em ufc/g de material	65
Figura 35.	Valores médios de crescimento de <i>Escherichia coli</i> em gaze	66
Figura 36.	Valores médios de crescimento de <i>Escherichia coli</i> em não tecido	66
Figura 37.	Valores médios de crescimento de <i>Escherichia coli</i> em plástico	67
Figura 38.	Valores médios de contaminação ao longo do armazenamento	68
Figura 39.	Valores médios de crescimento microbiano ao longo do armazenamento em gaze	68
Figura 40.	Valores médios de crescimento microbiano ao longo do armazenamento em não tecido	69
Figura 41.	Valores médios de <i>Trichoderma reesei</i> após esterilização	70
Figura 42.	Valores médios de <i>Escherichia coli</i> após esterilização	70
Figura 43.	Actividade enzimática da desidrogenase	71

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades físicas e químicas do óxido de etileno puro	9
Tabela 2.	Resistência de alguns microrganismos à exposição ao óxido de etileno	12
Tabela 3.	Carga microbiana existente no ar em períodos de produção e em ausência de produção	51
Tabela 4.	Carga microbiana existente nas superfícies	53
Tabela 5.	Carga microbiana existente nos manipuladores em diferentes condições ambientais	55
Tabela 6.	Contaminação microbiana existente na matéria-prima de gaze e em não tecido	57
Tabela 7.	Contaminação microbiana existente na matéria-prima de plástico e metal	58
Tabela 8.	Contaminação microbiana existente nos produtos menos manipulados	60
Tabela 9.	Contaminação microbiana existente nos produtos mais manipulados	60
Tabela 10.	Valores médios de <i>Trichoderma reesei</i> em ufc/g de material	62
Tabela 11.	Valores médios de <i>Escherichia coli</i> em ufc/g de material	65
Tabela 12.	Valores médios de carga microbiana ao longo do armazenamento	67
Tabela 13.	Valores médios de <i>Trichoderma reesei</i> após esterilização por óxido de etileno	69
Tabela 14.	Actividade enzimática da desidrogenase	71

## *Capítulo I*

---

### *Introdução*

## **1. Dispositivos médicos**

Os dispositivos médicos são, nas diferentes áreas da saúde, instrumentos essenciais para a redução da doença, melhoria da saúde e qualidade de vida dos cidadãos. Os dispositivos médicos englobam uma vasta gama de produtos onde se inclui o material de penso, o material cirúrgico, o equipamento de raio X, as tiras para controlo de diabetes, os pacemakers, entre muitos outros. Os dispositivos médicos baseiam-se hoje numa variedade de tecnologia incluindo a engenharia mecânica, os biomateriais, a electrónica, o software, a óptica, a imagiologia para diagnóstico, entre outros ([www.infarmed.pt](http://www.infarmed.pt), 2010).

Estes dispositivos são hoje essenciais na prática médica. A necessidade de desinfeção e esterilização de dispositivos médicos tem sido referida em vários estudos científicos (Rutala *et al.*, 1999). Estes referem a existência de infeções relacionadas com saneamento inadequado, falhas na desinfeção e esterilização, que muitas vezes levam à morte do paciente (Rutala *et al.*, 1999).

A esterilização consiste na exposição dos dispositivos médicos a um agente esterilizante, durante um determinado período de tempo, em condições de temperatura, pressão e humidade ajustadas e controladas. Um dos factores que influencia estas condições é o tipo de embalagem que os contém.

### **1.1. Embalagem de dispositivos médicos para esterilização**

As embalagens plásticas são utilizadas em quase todos os sectores de actividade industrial e comercial, nas quais se engloba o sector dos dispositivos médicos, podendo ser divididas em flexíveis e rígidas. Além de embalar, a embalagem tem a função de chamar a atenção, descrever as características do produto, criar a confiança do consumidor e produzir uma impressão global favorável. Alguns clientes dão prioridade ao design, à funcionalidade e à qualidade. Embalagens bem desenhadas podem criar valor de conveniência para o consumidor e valor promocional para o fabricante dos bens de consumo ([www.sterigenics.com](http://www.sterigenics.com), 2010).

A embalagem final dos dispositivos médicos é obtida pela colagem de papel a um filme, podendo este ser rígido ou flexível, sendo colado através de calor (Crippa, 2006) O papel lacado surgiu para se reduzir o risco de rasgar ou de se soltarem partículas na abertura da embalagem em blocos operatórios ou nas urgências. A laca tem a

particularidade de selar bem ao polietileno, sendo esta a parte que efectivamente cola ao filme. O papel diz-se laminado porque pode ter várias camadas, ou seja, polipropileno mais polietileno, sendo este componente o que possui as propriedades ideais para colar à laca do papel (Crippa, 2006).

O polietileno (PE) é, entre os plásticos comerciais, o que tem a estrutura mais conhecida e a mais simples (Roman, 1997). O PE é um polímero parcialmente cristalino e flexível, cujas propriedades são acentuadamente influenciadas pelas quantidades relativas das fases amorfa e cristalina. Em condições normais, os polímeros etilénicos não são tóxicos, podendo inclusive, ser utilizados em contacto com produtos alimentícios e farmacêuticos (Coutinho *et al.*, 2003).

O polipropileno possui um conjunto de propriedades atractivas para a produção de muitos produtos manufacturados. Nestas propriedades, inclui-se a boa resistência química, à humidade e ao calor, além da baixa densidade, boa dureza superficial e a estabilidade dimensional (Smith, 1999).

Para a embalagem rígida dos dispositivos médicos é utilizado o filme de politereftalato de etileno, também conhecido como poliéster ou PET.

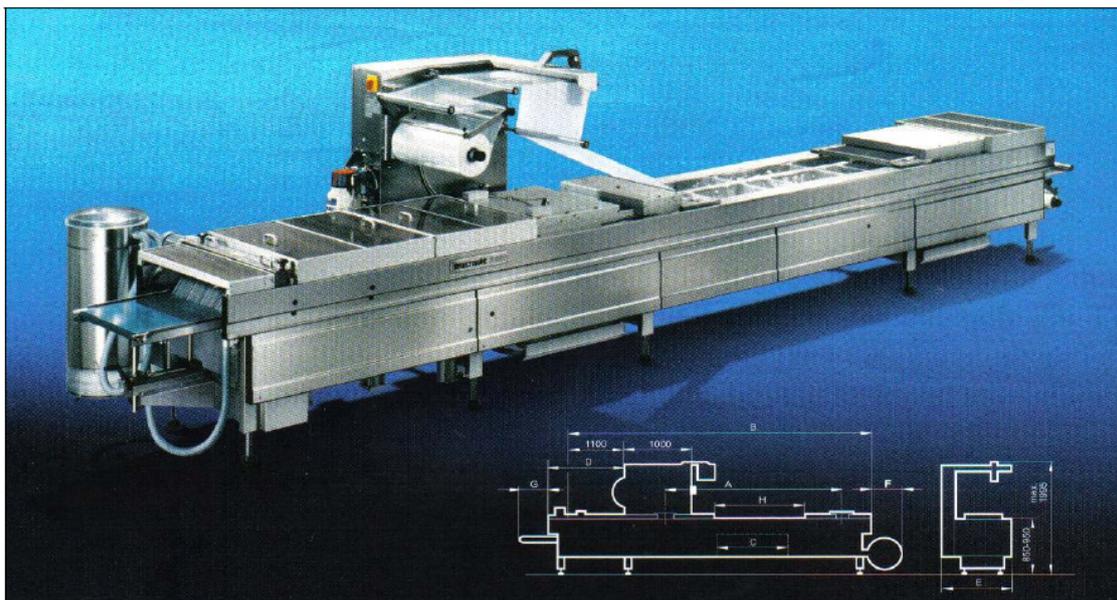
Os poliésteres são conhecidos desde a década de 30, porém, a primeira síntese do polímero com alto peso molecular foi efectuado em 1942, com potencial reconhecido na época para aplicações como fibra. Como potencial de embalagem, o filme de PET biorientado tornou-se disponível nos anos 60, com grande aceitação para acondicionamento de alimentos. Em 1973, o processo de injeção e sopro com biorientação, desenvolvido pela empresa Dupont, introduziu o PET na aplicação como garrafa, o que revolucionou o mercado de embalagem principalmente o de bebidas gasosas (Sarantópoulos *et al.*, 2002).

O PET apresenta boas propriedades de barreira ao oxigénio e ao dióxido de carbono, as quais podem ainda ser melhoradas pela orientação biaxial, que proporciona também excelentes propriedades de barreira a aromas (Hernandez *et al.*, 2000). Quer a embalagem flexível quer a rígida são obtidas através da termoformação.

A termoformação é um método de formação de folhas ou filmes plásticos para utilização em embalagens através da utilização de um molde. O processo de termoformação é constituído por três etapas: aquecimento, formação e corte do filme. Cada uma destas três etapas deve ser correctamente executada para que a embalagem seja formada adequadamente (Xu e Kazmer, 2001).

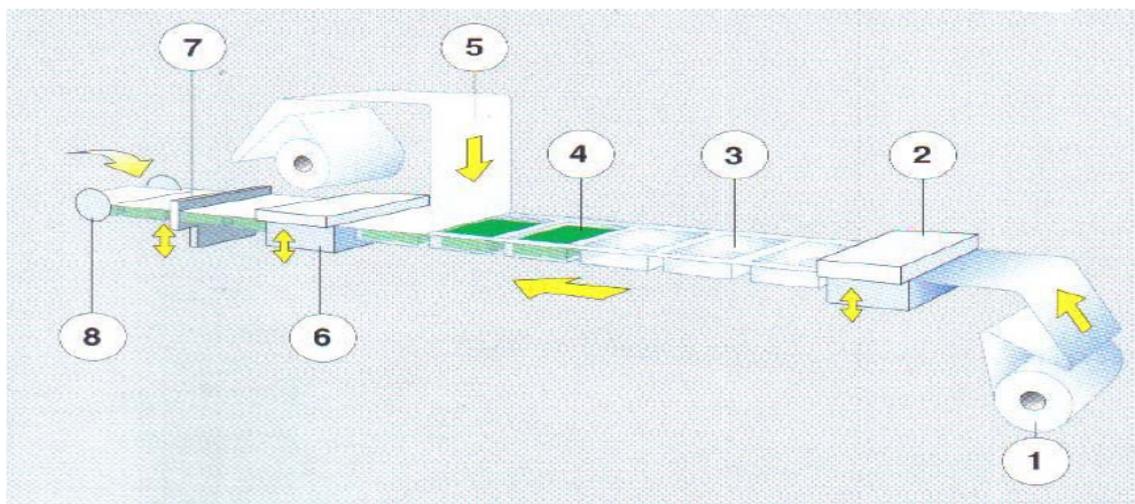
Os filmes termoformados são muito utilizados na indústria farmacêutica, dada a sua facilidade de utilização em linha de produção industrial (termoformação, enchimento e selagem) (Pettersen *et al.*, 2004).

A **figura 1** apresenta ilustrativamente a fotografia de um equipamento de termoformação de filmes plásticos (Multivac trademark catálogo, 2004).



**Figura 1** – Equipamento de termoformação de filmes (Fonte: Multivac trademark catálogo, 2004).

A **figura 2** mostra um desenho esquemático da etapa de termoformação de um filme plástico (Multivac trademark catálogo, 2004).



- |   |   |
|---|---|
| 1 - Bobine do filme;                          | 5 - Bobine do papel;                    |
| 2 - Câmara de termoformação;                  | 6 - Câmara de extracção de ar, selagem; |
| 3 - Filme termoformado;                       | 7 - Corte transversal do filme;         |
| 4 - Inclusão manual ou automática do produto; | 8 - Corte longitudinal do filme;        |

**Figura 2** - Etapas de termoformação do filme (Fonte: Multivac trademark catálogo, 2004).

A embalagem dos dispositivos médicos deve ter informação suficiente de modo a facilitar a identificação do conteúdo e a rastreabilidade do produto, caso ocorram problemas relacionados com a embalagem ou a esterilização.

Segundo o Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho, e a Directiva n.º 2007/47/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho Europeu, a rotulagem dos dispositivos médicos deve conter de modo legível e indelével as seguintes informações: número do artigo, descrição do artigo, lote, método de esterilização, data de validade, ano de produção, fabricante, distribuidor e o número do organismo notificado (CE). Os processos de esterilização utilizados não podem alterar estas indicações obrigatórias.

## **1.2. Esterilização de dispositivos médicos**

Existem vários processos de esterilização de dispositivos médicos, os quais podem ser classificados em processos de esterilização físicos ou químicos de acordo com a natureza do processo utilizado. Entre os processos de esterilização por processos físicos, os mais utilizados são os processos de esterilização por vapor húmido, por calor seco e por radiação ionizante. Os processos de esterilização por meios químicos mais comuns envolvem a utilização de peróxido de hidrogénio, de óxido de etileno ou de formaldeído (Rutala *et al.*, 1999; Almeida, 2010).

### **1.2.1. Processos físicos de esterilização**

O vapor húmido é o método mais utilizado e o que oferece maior segurança em termos hospitalares, sendo um processo com mais de 100 anos de utilização industrial (Almeida, 2010). A utilização deste tipo de esterilização permite a utilização de tempos reduzidos em cada ciclo de esterilização, podendo ser utilizado em processos de rotina. Para além disso, este processo é dos menos perigosos para o meio ambiente e o custo do equipamento é reduzido. No entanto, este processo de esterilização não pode ser utilizado em material sensível ao calor, como, por exemplo, o plástico. Assim, é aplicável apenas nalgumas preparações farmacêuticas líquidas, e apresenta ainda a desvantagem de existirem algumas formas microbiológicas resistentes a este processo, como é o caso dos esporos (Almeida, 2010).

A esterilização por calor seco envolve a utilização de raios infravermelhos e estufas de ar seco. Este tipo de esterilização pode ser utilizado em material termoresistente (material de vidro ou de corte) ou em material que possa ser oxidado quando exposto

ao vapor. É um processo de esterilização seguro para metais e espelhos (por exemplo, em odontologia), uma vez que não os corrói nem os danifica (Almeida, 2010). Apresenta no entanto algumas desvantagens como: não tem capacidade penetrante, utiliza temperaturas muito elevadas, necessita de tempo de exposição prolongado, interfere na estabilidade de alguns materiais (por exemplo: borracha, derivados da celulose como o papel e tecido) e carboniza os materiais mais sensíveis a temperaturas superiores a 160°C (Almeida, 2010).

As reacções ionizantes são reacções de elevada energia emitidas por isótopos radioactivos ou produzidos por aceleração mecânica de electrões até velocidade e energias elevadas. Este tipo de esterilização é permitido apenas após confirmação da ausência de efeitos nocivos sobre o produto (dados experimentais), sendo a dose total administrada em tempo pré-definido. É um processo com mais de 50 anos de utilização industrial. Este processo apresenta as vantagens de se poder utilizar em materiais termosensíveis, ter um grande poder de penetração (radiação gama), atravessando as embalagens de cartão, papel ou plástico, pode ser utilizado em artigos descartáveis (fios de sutura, luvas, etc.) e não provocar danos físicos no material esterilizado como se verifica em outros métodos (Almeida, 2010). Tem a desvantagem de necessitar de pessoal muito especializado, de ser um processo relativamente caro e de ser necessário um controlo médico dos manipuladores, requerer a realização de testes de resistência, de modo a determinar-se a dose adequada de esterilização. Este processo de esterilização envolve uma tecnologia economicamente inacessível aos fabricantes de dispositivos médicos; a qualificação da unidade e a validação do processo são também muito complexas (Almeida, 2010).

### **1.2.2. Processos químicos de esterilização**

A esterilização utilizando o peróxido de hidrogénio é bastante utilizada em materiais que têm por base o alumínio, bronze, látex, silicone, borracha, aço inoxidável e materiais eléctricos (Almeida, 2010). Este processo tem como vantagens a utilização de baixas temperaturas e humidade, elevado poder de penetração, ausência de resíduos no final do processo, não ser oxidante nem necessitar de um período de arejamento. No entanto é um processo extremamente caro e não pode ser utilizado em derivados de celulose (Almeida, 2010).

Outro processo de esterilização envolve a utilização de formaldeído. Este processo consiste na imersão em solução aquosa ou alcoólica ou ainda em autoclave por junção de formaldeído gasoso (2%) e vapor a baixa temperatura. É um processo de fácil execução e pode ser utilizado para materiais termossensíveis. No entanto, a perda de actividade na presença de matéria orgânica, o odor forte e irritante, a sua elevada toxicidade e a presença de resíduos tóxicos nos materiais tornam-no muito desvantajoso na maioria dos dispositivos. Para além disso, o processo é demorado (desinfecção 30 minutos e esterilização 18 horas) e a sua formulação alcoólica corrói metais, danifica lentes, instrumentos ópticos, materiais de plástico e borracha (Almeida, 2010).

O processo de esterilização por óxido de etileno é um dos processos químicos mais utilizados (Possari, 2003).

## **2. Esterilização por óxido de etileno**

O óxido de etileno (OE) foi descoberto em 1859 por Wurtz, sendo um agente químico de alta eficácia no que se refere à esterilização de dispositivos, actuando mesmo a baixas temperaturas, possuindo também um alto poder de penetração (Demarzo, 1997).

O OE começou a ser produzido comercialmente em 1921, sendo utilizado na pulverização de produtos têxteis e livros, e como insecticida na agricultura (Cotton e Roark, 1928). O óxido de etileno foi também utilizado na indústria do tabaco, diminuindo o tempo de envelhecimento, reduzindo assim o conteúdo de nicotina (Carballo, 1987).

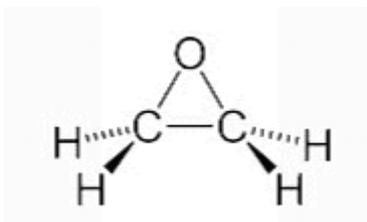
Após a II Guerra Mundial, vários cientistas ao procurarem um novo agente esterilizante, que possuísse poder bactericida, esporicida, que fosse eficaz mesmo a baixas temperaturas e que penetrasse mesmo em substâncias porosas e que não corresse ou danificasse os materiais termossensíveis, verificaram que o óxido de etileno era o agente que mais se aproximava dos requisitos que eles pretendiam (Nogueira *et al.*, 1984). Em 1949, o óxido de etileno passou a ser utilizado como agente esterilizante, após a determinação dos parâmetros necessários à sua acção esporicida. A partir desta data as indústrias passaram a utilizá-lo como esterilizante de alimentos e condimentos importados (Possari, 2003).

A partir de 1962, começou a ser utilizado na esterilização de dispositivos médicos sensíveis ao calor (Herance, 1990; Nogueira, 1994; Nogueira, 1985). Na década de 70, a esterilização por óxido de etileno passou a ser a principal forma de esterilização, especialmente nos Estados Unidos, onde foi registada a utilização de mais de 10 000 esterilizadores de óxido de etileno em hospitais (Glaser, 1997).

Actualmente, existem autoclaves para esterilização por óxido de etileno com diversos tamanhos, em que as variáveis críticas do processo (temperatura, humidade, pressão e tempo de exposição) são ajustadas e controladas automaticamente.

## 2.1. Propriedades do óxido de etileno

O óxido de etileno é um éter cíclico. A **Figura 3** mostra a sua estrutura química e na **tabela 1** estão descritas algumas das suas características físicas (O'Neil *et al.*, 2001).



**Figura 3** – Estrutura química do óxido de etileno (Fonte: Adaptado de Possari, 2003).

A fórmula molecular do óxido de etileno é  $C_2H_4O$ , sendo a sua massa molar de  $44,05 \text{ g.mol}^{-1}$  (World Health Organization, 2003). Apresenta-se sob a forma de gás incolor, de fácil liquefacção, podendo transformar-se num líquido incolor (Tsai *et al.*, 2003). O óxido de etileno é solúvel em água, acetona, metanol, éter, benzeno e tetracloreto de carbono (O'Neil *et al.*, 2001).

O seu ponto de ebulição é  $10,4^\circ\text{C}$ , temperatura à qual é totalmente miscível em água, especialmente se o pH for entre 2,0 e 3,0. O ponto de congelação é de  $-112,6^\circ\text{C}$ . A sua temperatura crítica é, aproximadamente, de  $196^\circ\text{C}$  (Possari, 2003). A **tabela 1** mostra algumas propriedades físicas do óxido de etileno.

O OE é muito instável, sendo bastante reactivo e, por isso, pode causar graves danos quando aquecido ou quando em contacto com hidróxidos de metais alcalinos ou determinadas superfícies catalíticas (Pekalski *et al.*, 2005). Em concentrações superiores a 3% v/v, no ar, é altamente inflamável, podendo explodir, se as medidas de segurança não forem estabelecidas e respeitadas (Demarzo, 1997).

**Tabela 1** – Propriedades físicas e químicas do óxido de etileno puro (Fonte: Ficha de segurança, 2010)

<b>Propriedades físicas e químicas</b>	
Estado físico a 20°C	Gás
Cor	Incolor
Cheiro	Levemente etéreo; dificilmente detectável pelo cheiro a baixas temperaturas
Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	44,05
Ponto de congelamento, a 1 atm (°C)	-112,6
Ponto de ebulição, a 1 atm (°C)	10,4
Temperatura crítica (°C)	196
Pressão de vapor (a 20°C) / bar	1,4
Densidade relativa, gás (ar=1)	1,5
Densidade relativa, líquido (água=1)	0,89
Solubilidade na água, v/v	Completa
Gama de inflamabilidade / % vol. de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O no ar	3 a 100
Temperatura de auto-inflamação (°C)	Desconhecida
Outros dados	Gás mais denso que o ar, pode acumular-se em espaços confinados, em especial, ao nível ou abaixo do solo

O óxido de etileno possui ainda propriedades físicas e químicas importantes para a sua utilização como agente de esterilização em dispositivos médicos: boa difusão nos materiais porosos, boa difusão e adsorção na maioria dos plásticos termossensíveis, boa acção superficial sobre instrumentos metálicos termossensíveis e não deteriora os dispositivos médicos mais sensíveis.

A combinação destas propriedades possibilitou a sua ampla difusão como agente de esterilização, já que lhe permite penetrar através das membranas das embalagens (em especial, o filme de polietileno) que contêm os elementos a esterilizar e nas

dobras e nos lugares mais inacessíveis dos elementos a esterilizar, e efectuar a esterilização na faixa de 25 a 55°C, garantindo a não deformação e/ou a não destruição dos elementos a esterilizar (Possari, 2003).

O óxido de etileno puro é tóxico, potencialmente cancerígeno, teratogénico, mutagénico e neurotóxico (Possari, 2003). O óxido de etileno puro não é recomendado para a esterilização de dispositivos médicos, devido à sua toxicidade, inflamabilidade e explosividade ao atingir a concentração de 3% no ar (Possari, 2003). Para a sua utilização, é recomendada a sua mistura com gases inertes, como: dióxido de carbono (a 10% e 90% de óxido de etileno) ou com hidrocarbonetos fluorados, como o diclorofluorometano (a 88% e óxido de etileno a 12%) (Possari, 2003), (Madeleine et al., 2003).

## **2.2. Mecanismo de acção do óxido de etileno nas células**

O óxido de etileno tem um elevado poder de penetração, atingindo constituintes essenciais da matéria viva: Ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e membranas. Durante o processo de esterilização o óxido de etileno vai actuar a nível das membranas, dos ácidos nucleicos e das proteínas (Pittet *et al.*, 1997).

Ao ser absorvido pelas membranas, o óxido de etileno vai provocar danos irreversíveis nas proteínas e ácidos nucleicos, uma vez que o óxido de etileno tem uma acção alquilante sobre diversos grupos electronegativos do DNA e das proteínas, capaz de adicionar um grupo alquilo a estas macromoléculas. Esta alquilação provocará uma deformação da estrutura da proteína e perda das suas funções. As lesões nos ácidos nucleicos, por quebra da cadeia do DNA ou formação de pontes entre as cadeias do ácido nucleico, provocam a interrupção da replicação e das funções fisiológicas normais ([www.sterigenics.com](http://www.sterigenics.com), 2010).

A alteração da permeabilidade das membranas vai provocar uma lesão nas membranas celulares, originando a saída do conteúdo celular para o meio circundante, interferindo com a integridade celular e, conseqüentemente, com a vida da célula (Possari, 2003).

### **2.3. Esterilização e resistência de formas microbianas**

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), para processos de esterilização é requerido um nível de segurança de esterilidade, conhecido como *Sterility Assurance Level* (SAL), de  $10^{-6}$ , sendo este o número definido como margem de segurança nos processos de esterilização (Padoveze, 2003).

A esterilização elimina os microrganismos e os seus esporos, no entanto, durante o ciclo de esterilização, os microrganismos não são eliminados todos de uma só vez, mas sim gradualmente. Quanto maior for a carga microbiana (*bioburden*) num artigo antes da esterilização, mais tempo será necessário para eliminar a população inteira. Assim, é imperativo que o número de microrganismos seja reduzido pela completa limpeza antes da esterilização (Padoveze, 2003).

Para os processos de esterilização define-se o valor D (Tempo de Redução Decimal), o qual é o tempo no qual uma população bacteriana é reduzida a 10%, ou o tempo necessário para reduzir a população a um ciclo logarítmico a uma dada temperatura. Esse valor, expresso em minutos, é utilizado para estabelecer processos de esterilização térmica. Esse tempo representa a velocidade de morte de um determinado microrganismo dada uma temperatura. Portanto, o valor D representa o tempo necessário para a redução de um ciclo logarítmico na concentração inicial de microrganismos (Graziano, 2000).

A morte dos microrganismos ocorre em curva exponencial, na qual, num dado momento designado por valor D (Tempo de Redução Decimal), 90% dos microrganismos morrem; seguidamente serão eliminados a mesma percentagem dos 10% restantes do primeiro valor D, e assim sucessivamente até se obter um nível de segurança de  $10^{-6}$ , em que o valor D tenha sido aplicado por 12 vezes para um artigo contaminado (Graziano, 2002). Quanto menor for o *bioburden*, maior a probabilidade de se atingir o nível de segurança (SAL) de  $10^{-6}$  (Mendes *et al.*, 2007). A esse nível de segurança, a probabilidade de se encontrar uma vida microbiana viável em um milhão será tanto menor quanto mais baixo for o contingente inicial de microrganismos. A limpeza dos artigos é imprescindível para garantir a eficácia de qualquer processo de esterilização (Graziano, 2002).

### 2.3.1. Resistência de formas microbianas à exposição ao óxido de etileno

Os esporos bacterianos são a forma mais resistente à destruição por óxido de etileno. Dois gêneros, *Bacillus* e *Clostridium*, incluem a grande maioria de bactérias formadoras de esporos (Ferraz, 1988). Algumas células vegetativas de espécies do gênero *Bacillus* são destruídas quando submetidas a tempos de aquecimento de 60°C durante um minuto, enquanto o mesmo organismo no estado esporulado pode sobreviver diversos minutos a 120°C (Padoveze, 2003). A **tabela 2** mostra a resistência de alguns microrganismos ao óxido de etileno.

**Tabela 2** – Resistência de alguns microrganismos à exposição ao óxido de etileno (Fonte: Ferraz, 1998)

<b>Microrganismos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Concentração de óxido de etileno (mg/L)</b>	<b>Valor D (minutos)</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	40	700	14,5 a 15,3
<i>Clostridium botulinum</i>	40	700	11,0 a 11,5
<i>Salmonella sp</i>	40	700+/- 20	3,3 a 5,9
<i>Streptococcus faecalis</i>	54	500	2,0 a 3,75
<i>Saccharomices cerevisae</i>	30	700	5,0

Quanto maior o valor D, maior a resistência do microrganismo ao agente esterilizante. Os microrganismos da Tabela 2 são aqueles que, geralmente, apresentam maior resistência à esterilização por óxido de etileno. Por este motivo, o *Bacillus subtilis* é o microrganismo usualmente utilizado como indicador biológico para esterilização por óxido de etileno (Possari, 2003).

### 2.4. Processo de esterilização

O processo de esterilização por óxido de etileno é utilizado normalmente quando não é possível usar qualquer outro método, funcionando como uma alternativa para o material que não pode ser esterilizado pelo calor ou por agentes esterilizantes líquidos, para dispositivos de administração parentérica, instrumentos de uso intravenoso e de

uso cardiovascular, instrumentos telescópicos, e outros dispositivos médicos que não podem ser expostos ao calor ou a agentes esterilizantes líquidos (Almeida, 2010).

O processo de esterilização utilizando o óxido de etileno apresenta várias vantagens, entre as quais: esteriliza a baixas temperaturas, tem facilidade de penetração nos diferentes materiais (ex: borracha, material plástico, instrumentos ópticos delicados) e é quimicamente inerte para a maioria dos materiais sólidos (Almeida, 2010).

Apresenta, no entanto, algumas desvantagens: elevado custo na aquisição do equipamento, dimensões das instalações e elevada toxicidade (irritação tecidual por deficiente dissipação do óxido de etileno) (Almeida, 2010).

Para além disso, o óxido de etileno é acondicionado na forma líquida em cilindros de aço inoxidável, com capacidade de 115 a 690 kg. O óxido de etileno também é comercializado em pequenos cilindros para utilização em pequenas câmaras utilizadas a nível hospitalar (**figura 4**). No processo de esterilização é importante que se controle o consumo do gás OE; após cada ciclo de esterilização, este controlo é efectuado através do peso do cilindro (Possari, 2003).



**Figura 4** – Cilindro de óxido de etileno numa câmara de esterilização a nível hospitalar

O processo de esterilização por óxido de etileno apesar de ser um processo que utiliza um gás altamente tóxico, cancerígeno e mutagénico (Madeleine *et al.*, 2003), (Pithon *et al.*, 2010), foi o processo escolhido pela Medirm para esterilizar os seus dispositivos médicos. Isto porque, apesar de perigoso, é um processo com um índice de esterilização muito elevado, uma vez que possui poder bactericida, esporicida e virucida. Ele permite uma boa esterilização dos dispositivos médicos independentemente da forma que estes possuam, não sendo reduzido o seu poder esterilizante pelo facto destes se encontrarem embalados.

Este processo pode tornar-se não inflamável e mais seguro de manusear, se o óxido de etileno for misturado com outros gases inertes, nomeadamente com CO<sub>2</sub> e fluorocarbonetos (Almeida, 2010).

A esterilização através do óxido de etileno é sempre realizada na presença de vapor de água. A água é um agente solvente ionizante que inicia a reacção de alquilação através da formação de um complexo activo, com grupos funcionais não-protonados, sendo as moléculas do óxido de etileno solubilizadas pela camada de água que envolve os microrganismos, facilitando o contacto com os locais onde ocorre a reacção (Possari, 2003).

Durante a validação do processo de esterilização deve proceder-se à demonstração de ausência de danos no produto, bem como a adequação das condições para remover gases de forma a reduzir os teores de gás residual nos dispositivos médicos (Almeida, 2010).

A eficácia do processo de esterilização de um dispositivo médico é avaliada com base numa série de experiências e protocolos que devem demonstrar que o processo de esterilização e os controlos associados são reprodutíveis e que o produto final pode ser designado como estéril ([www.infarmed.pt](http://www.infarmed.pt)).

#### **2.4.1. Etapas do processo de esterilização**

O processo de esterilização por óxido de etileno engloba o pré-acondicionamento, a humidificação, a esterilização e o arejamento. Nessa fase devem estar estabelecidas as condições controladas durante um período de tempo definido (Possari, 2003).

##### **2.4.1.1. Pré-acondicionamento**

Após acondicionamento em embalagem final, os dispositivos médicos são colocados em paletes, como mostra a **figura 5**, sendo posteriormente colocados numa sala ou câmara onde é aplicado um tratamento de modo a que toda a carga atinja níveis pré-determinados de temperatura e humidade relativa (Possari, 2003).



**Figura 5** – Configuração da carga em paletes (Fonte: imagens recolhidas na Medirm)

#### **2.4.1.2. Humidificação**

A humidade relativa representa a variação da quantidade de água presente no ar em relação à maior quantidade de água que pode conter na mesma temperatura. É um dos parâmetros mais importantes, porque interfere na letalidade do agente esterilizante (Possari, 2003).

Durante o ciclo de esterilização, a pressão começa a baixar com tendência a atingir o valor zero, e o vapor de água é introduzido na câmara em quantidade suficiente de modo a obter-se 40% a 60% de humidade relativa sem aumentar a temperatura dos artigos a mais de 54°C. Esta fase dura em média, dez minutos. O efeito microbicida óptimo do óxido de etileno é observado por volta de 45% de humidade relativa (Possari, 2003).

#### **2.4.1.3. Esterilização**

A esterilização consiste na exposição dos dispositivos médicos ao agente esterilizante, durante um determinado período de tempo e em determinadas condições de pressão e temperatura. A quantidade mínima necessária de agente para a esterilização dos

artigos é determinada através do teste de esterilidade dos produtos (Mendes *et al.*, 2007).

O tempo de contacto dos dispositivos médicos ao agente esterilizante pode variar entre três a quatro horas com temperatura de 55°C. O tempo de exposição pode variar em função das cargas, que são diferenciadas pela contaminação relativa, densidade, conteúdo e permeabilidade ao OE (Mendes *et al.*, 2007).

O aumento da temperatura provoca a dilatação dos plásticos e papéis, o gás fica mais reactivo, facilitando a sua penetração nos artigos. Consequentemente, temperaturas mais elevadas possibilitam ciclos menores. A temperatura usualmente utilizada varia entre os 47°C e 60°C, mas geralmente usa-se a temperatura de 55°C. A temperatura afecta também a pressão do gás. A temperatura e a pressão devem ser atentamente observadas e controladas (Possari, 2003).

#### **2.4.1.4. Arejamento**

Fases do processo de esterilização, na qual os resíduos do óxido de etileno são desadsorvidos do dispositivo médico, até atingirem um nível pré-determinado (www.infarmed.pt). Segundo a norma NP EN ISO 10993-7, a dose média diária de OE para o doente não deve ser superior a 0,1mg/dia. Para dispositivos de exposição prolongada a dose média diária de OE para o doente não deve ser superior a 2mg/dia.

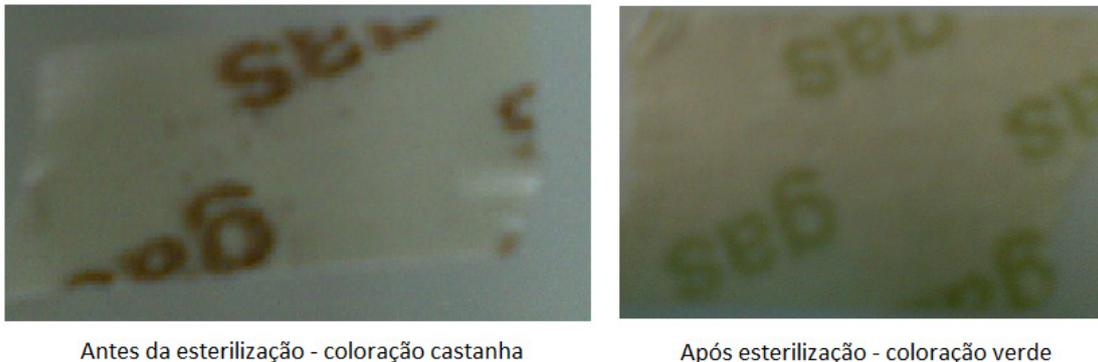
#### **2.5. Controlo do processo de esterilização**

Num processo de esterilização por óxido de etileno não devem ser controladas apenas as condições físicas, como sendo a temperatura, pressão, concentração de gás e humidade relativa. Devem ser controladas e monitorizadas as condições e as variáveis físicas, químicas, biológicas, e efectuados testes de esterilidade, de modo a garantir que o processo de esterilização foi eficaz (Almeida, 2010). É também necessário proceder ao controlo de diversas variáveis relativas aos manipuladores e ao controlo ambiental do processo (www.infarmed.pt).

### 2.5.1. Controlos físicos, químicos e microbiológicos

Estes controlos são efectuados na câmara onde decorre o processo de esterilização, adiante designado por esterilizador, através da observação dos diversos parâmetros essenciais para o processo de esterilização, como a temperatura, pressão, concentração do gás no interior da câmara e humidade relativa. O esterilizador funciona num ciclo automático, fixo, controlado por um microprocessador. Todos os parâmetros principais do processo de esterilização são supervisionados durante o funcionamento do esterilizador, obtendo-se no final de cada ciclo, um registo impresso dos parâmetros do processo (Possari, 2003).

Os controlos químicos são utilizados para monitorização individual dos pacotes. Após selagem dos *peel packs* (saco selado nos quatro cantos contendo diversos dispositivos médicos), estes são colocados em pequenas caixas de cartolina fechados com um pedaço de fita de gaze especial que, como mostra a **figura 6**, funciona como um indicador de processo.



**Figura 6** – Indicador químico do processo de esterilização (Fonte: Imagens retiradas na Medirm).

O indicador químico de processo é constituído por um sistema químico aplicado a um substrato (tiras de papel crespado especialmente tratado e coberto com adesivo à base de resina e borracha), alterando a sua coloração quando submetido às condições de esterilização a óxido de etileno. Antes da esterilização a cor da palavra gaze é castanha, passando para verde após esterilização (**figura 6**) (Possari, 2003).

Este tipo de indicador é o mais utilizado em indústria. A nível hospitalar são normalmente utilizados indicadores de esterilização com integrador (ISO 11140-1).

O integrador (**figura 7**) consiste numa película sensível ao OE e à temperatura, acondicionada numa embalagem formada por uma lâmina de papel filme e outra por

lâmina de papel filme e metal laminado, com pastilhas na forma sólida e um papel condutor, podendo existir também na forma de tiras de papel impregnado com substâncias químicas que mudam de coloração aquando exposta às condições de tempo, temperatura, concentração de gás e humidade relativa. A **figura 7** mostra uma tira de indicador com integrador. A finalidade deste indicador é verificar a eficácia de todos os parâmetros indispensáveis a um processo de esterilização por óxido de etileno (Possari, 2003).



**Figura 7** – Indicador com integrador (Fonte: catálogo da 3M)

Recomenda-se a utilização de uma unidade em cada pacote, principalmente, na zona de maior dificuldade de penetração do OE, ou seja, no centro geométrico da carga. A difusão incompleta da pastilha ou a mudança não uniforme na tira de papel significa que os parâmetros do processo de esterilização não foram atingidos (Possari, 2003).

### **2.5.2. Controlo microbiológico**

Os controlos biológicos, podendo ser também denominados de controlos de carga, são efectuados através de indicadores biológicos e teste de esterilidade nos produtos, utilizados para o controlo da eficácia do processo de esterilização, e que monitorizam o ciclo de esterilização através da destruição real dos esporos dos microrganismos contidos no indicador biológico (Possari, 2003). O indicador controlo ou, mais especificamente, o indicador controlo não-esterilizado tem uma função muito importante. Ele demonstra que o meio de cultura e as condições de incubação utilizadas para o indicador são capazes de detectar a presença de qualquer esporo viável, que possa estar presente nos indicadores (Possari, 2003).

O indicador biológico de segunda geração (**figura 8**) é constituído por uma ampola contendo esporos secos de *Bacillus subtilis* (Mendes *et al.*, 2007). Esta é a forma

microbiana mais resistente ao processo de esterilização por óxido de etileno que se conhece (Possari, 2003), (Mendes *et al.*, 2007).



**Figura 8** – Indicador biológico para óxido de etileno (Fonte: 3M)

As ampolas são abertas e colocadas dentro de seringas, que por sua vez são colocadas dentro de envelopes identificados e numerados, como mostra a **figura 9**, sendo distribuídas em pontos estratégicos da câmara (Possari, 2003).



**Figura 9** - Indicadores biológicos distribuídos na unidade de carga do produto seleccionado (Fonte: 3M)

Após esterilização, as ampolas são quebradas, de modo a misturar o indicador de pH com o meio de cultura, sendo colocadas em incubadoras próprias (**figura 10**), a 37°C, durante 48h. A obtenção dos resultados é rápida e a sua interpretação deve ser efectuada através da observação da coloração apresentada pelo meio de cultura. Se a coloração original azul-esverdeada do meio não sofrer alteração, o processo foi eficaz, ou seja, todos os parâmetros foram alcançados e o artigo está esterilizado. Se, ao contrário, ocorrer uma alteração da cor original verde do meio de cultura para amarela, o processo não foi eficaz, isto é, não houve morte de todos os esporos. Este resultado significa que os esporos sobreviventes ao processo de esterilização passaram da forma vegetativa, multiplicaram-se formando excretas ácidas que são detectadas por meio de um indicador de pH presente no nutriente, mudando de coloração (Possari, 2003).



**Figura 10** – Estufa para incubação dos indicadores biológicos utilizados no processo de esterilização por óxido de etileno (Fonte: Catálogo da 3M)

Os testes biológicos são recomendáveis em cada carga (Farmacopeia, 2008).

### **2.5.2.1. Ensaio de esterilidade**

Muitos pesquisadores consideram um contra-senso estabelecer prazos de validade genéricos para os dispositivos médicos, uma vez que os factores contaminantes do ambiente variam extremamente entre os serviços. Cada serviço deve avaliar a possibilidade dos dispositivos chegarem aos pacientes, secos, sem sujidade e sem

danos independentemente do invólucro utilizado, para que não exista a possibilidade de um dispositivo recontaminado seja utilizado (Possari, 2003). Assim, a contaminação está relacionada a eventos e não a tempo. Deste modo, o prazo de validade deve ser determinado por cada serviço, levando em consideração a qualidade da embalagem, condições de armazenamento, transporte e principalmente as práticas de manuseio para produtos estéreis (Possari, 2003).

Definir um prazo de validade para a esterilização de um dispositivo médico é sempre empírico, pois, na prática, é impossível determinar exactamente o momento em que o artigo deixa de estar estéril e passa a estar contaminado. Por esse motivo, mesmo que uma empresa tenha realizado estudos controlados para estabelecer o tempo de armazenamento de artigos estéreis, existem factores que devem ser levados em consideração, nomeadamente: manusear delicadamente os dispositivos médicos, não utilizar os dispositivos médicos sob suspeita de abertura do invólucro, não utilizar os dispositivos médicos húmidos ou que pareçam estar humedecidos, não utilizar dispositivos médicos cuja embalagem apresente sujidade, não misturar dispositivos médicos estéreis com não estéreis, devolver todos os dispositivos médicos que não estejam identificados ou bem identificados (Possari, 2003).

A esterilidade é a ausência de microrganismos vivos. A realização de ensaios não é suficiente para garantir a esterilidade de um produto e a garantia da esterilidade passa igualmente pela aplicação de processos de produção convenientemente validados. É essencial estudar o efeito do método de esterilização escolhido sobre o produto (incluindo a embalagem final) do ponto de vista da eficácia e da manutenção da sua integridade e validar esse método antes de o colocar em prática. A escolha da embalagem deve ser compatível com o método de esterilização que se pretende utilizar (Mendes *et al.*, 2007). A utilização escrupulosa de um processo validado é condição a respeitar, sob pena de obter um produto não estéril ou deteriorado. Sempre que ocorram alterações no processo de esterilização deve ser efectuada nova validação. É óbvio que as normas de boas práticas de fabrico terão de ser respeitadas, principalmente no que diz respeito a utilização de pessoal qualificado e convenientemente treinado, utilização de locais adequados, utilização de equipamento de produção adequado, concebido para ser facilmente limpo e esterilizado, respeito pelas precauções necessárias para reduzir o risco de contaminação microbiana (biocarga) antes da esterilização, utilização de métodos validados em todas as etapas críticas da produção, vigilância do ambiente e controlos durante a produção (Possari, 2003).

As precauções a tomar para limitar a carga microbiana antes da esterilização incluem a utilização de compostos que apresentam um nível suficientemente baixo de contaminação microbiana (Farmacopeia, 2005).

O ensaio de esterilidade aplica-se a todas as substâncias, produtos, equipamentos, dispositivos médicos que, segundo a Farmacopeia são estéreis. Todavia, um resultado favorável significa que nenhum microrganismo contaminante foi detectado na amostra examinada nas condições de ensaio (Farmacopeia, 2005).

O teste de esterilidade é uma forma de garantir a eficácia do processo de esterilização. Mesmo que o resultado do teste biológico tenha sido negativo, é importante pesquisar se os dispositivos médicos estão estéreis, retirando um número significativo de amostras por lote para confirmar a esterilidade dos artigos. O valor de amostras por lote é dado na relação

$$\sqrt{n+1}$$

sendo  $n$  o número de artigos do lote nos casos de distribuição contínua (Farmacopeia, 2005).

São dois os tipos de teste de esterilidade: inoculação directa e inoculação indirecta (Ferraz, 1988).

A inoculação directa consiste na transferência da amostra directamente para o meio de cultura apropriado, sendo o conjunto incubado por um período de tempo e sob temperatura condizente após constatação da actividade não-bacteriostática do produto (Possari, 2003).

A inoculação indirecta (filtração através de membrana) consiste numa técnica de filtração através de membrana. É utilizada sempre que a natureza do produto o permita, nomeadamente em preparações aquosas filtráveis, alcoólicas ou oleosas, preparações solúveis em solventes aquosos ou oleosos ou miscíveis com esses solventes desde que não exerçam efeito antimicrobiano nas condições do ensaio (Farmacopeia, 2005).

A técnica consiste na remoção da carga contaminante da amostra, sendo seguidamente filtrada em membrana de acetato com porosidade definida (0,22  $\mu\text{m}$  ou 0,45  $\mu\text{m}$ ). Após filtração, a membrana é transferida para a placa com o meio de cultura apropriado. O meio de cultura utilizado é o ágar tripticolato de soja para bactérias aeróbias e psicrófilicas e fungos, e o meio tioglicolato (meio de Brewer modificado) para bactérias anaeróbicas. É uma técnica susceptível à contaminação, exigindo maior número de controlos, inclusive da integridade da membrana utilizada para filtração e retenção dos microrganismos (Ferraz, 1988).

Durante e no fim do período de incubação, devem-se examinar os meios que possam revelar macroscopicamente proliferação microbiana. Se a amostra indicar turvação do meio que torne difícil a detecção visual dum eventual crescimento microbiano após a incubação por 14 dias, deve transferir-se volumes apropriados do meio (no mínimo de 1 mL cada um) para novos recipientes contendo o mesmo meio fresco e incubar durante 4 dias, pelo menos o meio inicial e os meios transferidos (Farmacopeia, 2005). Se não houver qualquer manifestação de crescimento microbiano, o produto satisfaz o ensaio. Se for observado crescimento microbiano, o produto não satisfaz o ensaio, a não ser que se demonstre nitidamente que tal ensaio não é válido por motivos independentes do produto. O ensaio só pode ser considerado não válido se pelo menos uma das seguintes condições for observada:

- a) Os resultados do controlo microbiológico dos equipamentos utilizados nos ensaios de esterilidade apresentarem uma anomalia;
  - b) O exame do método experimental utilizado para efectuar o ensaio em questão apresentar uma anomalia;
  - c) Os padrões negativos apresentarem crescimento microbiano;
  - d) A identificação dos microrganismos isolados no final do ensaio demonstrar que o crescimento de esta(s) espécie(s) é sem qualquer dúvida imputável aos materiais e/ou às técnicas usadas para a realização do ensaio de esterilidade (Farmacopeia, 2005).
- Se o ensaio é considerado não válido, é repetido sobre o mesmo número de unidades que o ensaio inicial. Se não forem observados sinais de crescimento microbiano aquando da repetição do ensaio, a amostra satisfaz o ensaio. Se for observado crescimento microbiano aquando a repetição do ensaio, a amostra não satisfaz o ensaio (Farmacopeia, 2005).

### **2.5.3. Controlo de manipuladores**

Vários investigadores fizeram já referência aos danos biológicos provocados pela exposição ao óxido de etileno, dando especial ênfase aos seus potenciais efeitos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e neurotóxicos (Madeleine *et al.*, 2003), (Rusyn *et al.*, 2005). Por esse motivo deve-se proibir que menores, gestantes ou mulheres com idade fértil, excepto se comprovadamente estéreis, exerçam actividades nas salas de esterilização, na sala de arejamento e na zona de armazenamento das botijas do óxido de etileno, bem como na área de esterilização (Possari, 2003).

Foram efectuados vários estudos em laboratório com ratos, os quais foram expostos ao óxido de etileno a 100 ppm; após um dia de exposição os ratos foram sacrificados e

apresentavam algumas alterações no fígado e cérebro (Rusyn *et al.*, 2005; Nivard *et al.*, 2003).

Actualmente a toxicidade do óxido de etileno está devidamente identificada, pelo que podem ser reduzidos os riscos associados. A toxicidade pode ocorrer pela inalação ou por contacto directo com a pele e olhos, aparecendo sintomas agudos. Estes sintomas desaparecem com a respiração de ar puro e lavagem dos olhos e pele com uma quantidade abundante de água corrente, procedimentos semelhantes a diversos produtos tóxicos (Mendes *et al.*, 2007).

Os exames médicos são obrigatórios na admissão dos funcionários para a central de esterilização, devendo estes ser repetidos a cada seis meses (Possari, 2003). Assim devem ser efectuados os seguintes exames médicos: hemograma completo com contagem de plaquetas, urina do tipo I, perfil bioquímico (transaminase, desidrogenase láctica, espirometria para controlo de saúde) e como exame adicional, a obtenção de um raio X aos pulmões, devendo este ser efectuado a cada 5 anos, de modo a assegurar que os pulmões não sofram danos provocados pela exposição ao óxido de etileno. O funcionário deve ser informado de todos os riscos relacionados com a manipulação do óxido de etileno (Possari, 2003).

O capítulo VI da Portaria 482/1999, do Ministério da Saúde e do Ministério do Trabalho, estabelece as condições mínimas de saúde e segurança, expondo aos empregados e empregadores a maneira adequada de usar o gás protegendo os utilizadores. Entre elas, estão contempladas questões relacionadas com a utilização das instalações, obrigatoriedade de fornecimento (ao empregador) de equipamentos de protecção individual (EPI), assim como esclarecimento sobre os equipamentos de protecção colectiva (EPC).

Os equipamentos de protecção individual (EPI) que devem ser fornecidos aos funcionários são: luvas, botas, macacão em PVC (cloreto de polivinilo), máscara facial alimentada a ar comprimido filtrado durante as actividades de risco, como o carregamento e descarregamento da câmara e troca das botijas de óxido de etileno. Este equipamento tem de facilitar a movimentação dentro das áreas de risco. É ainda imprescindível que o EPI seja impermeável ao óxido de etileno (Possari, 2003).

Os equipamentos de protecção colectiva (EPC) são compostos por extintores, hidratantes com saída de água na mangueira em forma de chuveiro para atingir uma área maior, facilitando assim a eliminação do óxido de etileno pela reacção com a água e consequente formação de etilenoglicol. O chuveiro de emergência e os lava-olhos devem estar localizados em lugar de fácil acesso e visualização, fora das instalações sanitárias, próximo da zona de armazenamento das botijas de óxido de

etileno, assim como em outras zonas onde possam ocorrer acidentes com o óxido de etileno (Possari, 2003).

Existem Directivas como a *Occupational Health and Safety Assessment Specification* (OSHA), NP EN 14001, sobre a exposição dos funcionários ao óxido de etileno. Neste sentido a OSHA estabeleceu três níveis de exposição diferentes entre si. O primeiro nível designa-se por um limite de exposição permitido (PEL) no trabalho de 1 ppm de óxido de etileno como média ponderada num período de 8 horas. Significa que um colaborador não deve estar mais de 8 horas exposto ao óxido de etileno numa concentração de 1 ppm. O segundo nível designa-se por um nível de acção (AL) e refere-se a um limite inferior de 0,5 ppm, como média ponderada num período de 8 horas, que é usado para a determinação da necessidade de um controlo adicional. Em 1988, a OSHA estabeleceu um terceiro limite de exposição designado por limite de exposição por períodos curtos – 15 minutos (EL) de 5 partes por milhão (ppm). Significa que, um colaborador pode estar exposto a uma concentração de 5 ppm de óxido de etileno, apenas por períodos de curtos – 15 minutos. Este limite de exposição por curtos períodos está relacionado com as práticas de trabalho. Estas práticas estão relacionadas com a descarga do esterilizador, a transferência da carga para o arejador, a extracção do indicador biológico, descarga do arejador e a manipulação dos dispositivos durante o tempo de arejamento (Possari, 2003).

Para se determinar os níveis de PEL e AL, podem ser colocados monitorizadores pessoais nos manipuladores durante um período de 8 horas de trabalho.

O controlo necessário ao processo de esterilização por óxido de etileno deve estar referido em protocolo de modo a serem cumpridas as normas da OSHA. Este controlo passa pelo sinónimo do próprio equipamento, da instalação e organização da central de esterilização e das práticas de trabalho como sejam a transferência/manipulação da carga e o arejamento no esterilizador (Possari, 2003).

#### **2.5.4. Controlo ambiental**

O óxido de etileno eliminado durante o processo de esterilização deve ser tratado em caixa de borbulhamento antes de ser libertado na atmosfera ou no esgoto (Possari, 2003).

A caixa de borbulhamento, também conhecida como *scubber*, é construída com material resistente à solução ácida, geralmente em aço inoxidável Al 316 ou polipropileno combinado com fibras de vidro.

O tratamento consiste em fazer reagir o óxido de etileno com a água, formando etilenoglicol. Embora o óxido de etileno seja absorvido imediatamente pela água, a reacção para formar o etilenoglicol é muito lenta. Essa reacção pode ser acelerada pela adição de ácido sulfúrico (Possari, 2003).

Para reduzir a concentração de óxido de etileno, nas câmaras de esterilização pode utilizar-se um sistema de lavagem em coluna de enchimento, utilizando-se para tal uma coluna de enchimento com água e ácido sulfúrico em sistema de recirculação. A reacção demora vários minutos em concentração ácida (pH entre 2 e 3). A solução desce pela coluna assim que o sistema de recirculação é accionado. O processo de lavagem ocorre em duas fases, primeiro o óxido de etileno é absorvido pela solução ácida e, posteriormente ocorre uma reacção onde se forma o etilenoglicol. A reacção torna-se extremamente lenta quando a concentração do etilenoglicol atinge 12 % (Possari, 2003). Quando a solução atinge essa concentração deve ser trocada. É importante referir-se que para cada mole de etilenoglicol formado, um mole de água é consumido, permanecendo assim constante o número original de moles (Possari, 2003).

Antes de libertar a solução saturada contendo praticamente etilenoglicol na rede de esgoto, ela deve ser neutralizada, utilizando-se para tal soda cáustica.

O ponto de lançamento de resíduos de óxido de etileno para a atmosfera, oriundo da área de lavagem de gases, deve estar localizado em área de acesso restrito ao profissional autorizado, cujos limites de exposições não devem exceder 1 ppm de contaminação no ar para um dia normal de oito horas de trabalho (Possari, 2003).

#### **2.5.5. Controlo residual do óxido de etileno nos dispositivos médicos e no ambiente**

A cromatografia gasosa é o método indicado para o controlo do óxido de etileno e dos seus derivados (Possari, 2003). Os equipamentos utilizados devem permitir a leitura de concentrações que podem variar de 1 a 1000 ppm. Estes cromatógrafos devem permitir a identificação de vazamentos através de um monitor contínuo ou detector contínuo de gás. Esta técnica de controlo consiste na sucção de ar através de equipamentos manuais ou de diversos sensores instalados em pontos estratégicos de

todo o processo. O ar aspirado é transportado para o aparelho que possui um sistema de descodificação, indicando o valor em ppm (Possari, 2003).

#### **2.5.5.1. Método através de leitura directa**

O ar da zona de esterilização deve ser continuamente analisado, utilizando-se para tal uma bomba de vácuo. Esta deve existir nos seguintes locais: zona de armazenamento dos cilindros com as misturas esterilizantes, linhas de alimentação, área de esterilização e portas do autoclave, sala de apoio, corredores e sala de controlo. A amostragem de ar é efectuada através de uma válvula de injeção de gases, sendo definido um volume fixo a introduzir no cromatógrafo, sendo calculada a concentração de óxido de etileno no local da recolha da amostra. A concentração calculada é imediatamente comparada com valores previamente programados no integrador do cromatógrafo. Quando a concentração atinge os limites programados, é enviado um sinal de alarme para o ponto de amostragem e para a sala de controlo (Longhi, 1994).

#### **2.5.5.2. Método através de sensores ultra-selectivos**

Neste método são instalados sensores em todas as áreas, nomeadamente: zona de esterilização, manutenção de autoclaves, arejamento, armazenamento dos cilindros e arejamento ambiental. Esses sensores estão ligados a uma central, localizada na área do comando, com alarme visual e auditivo e impressão da quantidade e local. Quando a concentração de gás estiver acima de 1 ppm, é emitido um alarme em todas as áreas (Longhi, 1994).

#### **2.5.5.3. Controlo do óxido de etileno residual nos dispositivos médicos**

O método utilizado para verificação do óxido de etileno nos dispositivos médicos após esterilização é a cromatografia gasosa. (Farmacopeia, 2005).

A análise residual consiste na extracção da amostra misturada com solvente (água, álcool ou outro). Após injeção de 5 µL da solução no cromatógrafo, o OE é identificado pela comparação das distâncias de retenção com padrões submetidos nas mesmas condições cromatográficas de análise e a quantificação por comparação com

a área sob os picos do cromatograma (Longhi, 1994). Todos os limites são dados em µg de OE por grama de artigo (Possari, 2003).

## **2.6. Indicadores de contaminação microbiológica por marcadores bioquímicos**

Os ensaios enzimáticos são, normalmente utilizados para a determinação da actividade metabólica (Warscheid *et al*, 1990). Na bibliografia são referidos ensaios de actividade de desidrogenases como indicadores de presença e/ou actividade dos microrganismos nos ecossistemas que colonizam (Pankhurst *et al*, 2007).

Estes ensaios enzimáticos são procedimentos laboratoriais que medem a velocidade das reacções enzimáticas. Uma vez que as enzimas não são consumidas pelas reacções que catalizam, nos ensaios seguem-se habitualmente mudanças na concentração de substratos ou produtos para medir a taxa da reacção.

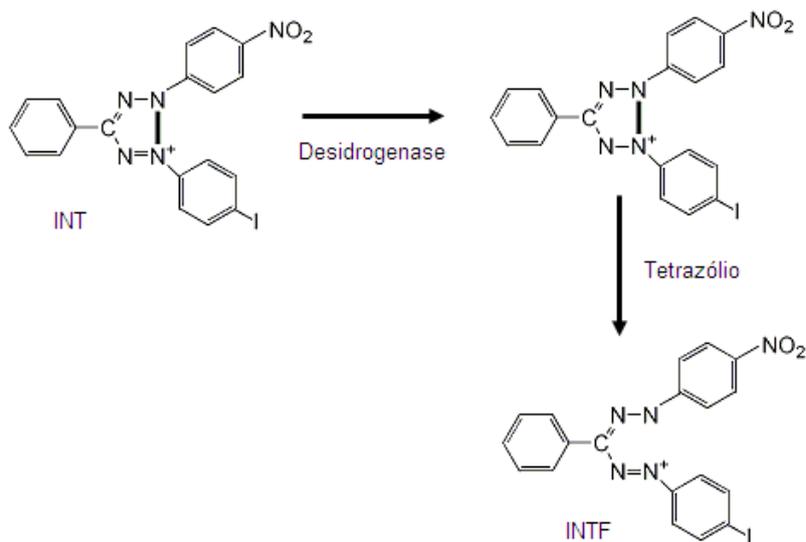
A actividade enzimática da desidrogenase tem sido utilizada como indicadores de presença de células vivas, nomeadamente em estudos efectuados em solos e em monumentos (Pankhurst *et al.*, 1997; Kandler *et al.*, 1999; Aira *et al.*, 1997).

De facto, as desidrogenases (EC 1.2.1.2) são enzimas do grupo das oxidoredutases, enzimas envolvidas nas vias metabólicas centrais das células microbianas (Lianes, 2008). Por isso, podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos pois permitem a detecção de células viáveis (Lianes, 2008). Estes enzimas estão relacionados com a oxidação de substâncias orgânicas em condições aeróbias e com a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa (Caravelli *et al.*, 2004).

Para a determinação da actividade de desidrogenase utilizam-se normalmente sais de tetrazólio como substrato (Camina *et al.*, 1998). A redução de sais de tetrazólio tornou-se uma das ferramentas utilizadas como um indicador da actividade da desidrogenase (Mosher *et al.*, 2003; Caravelli *et al.*, 2004). O Cloreto 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) é dos sais mais utilizados, uma vez que proporciona uma boa estimativa da actividade da desidrogenase, devido ao facto do INT possuir uma grande afinidade electrónica. O INT compete melhor que o oxigénio pelos electrões livres, logo não é necessário realizar as determinações em condições anaeróbias (Camina *et al.*, 1998).

Na presença do enzima desidrogenase ocorre uma remoção do hidrogénio do INT formando-se o tetrazólio. Este vai inserir-se entre a ubiquinona e o citocromo b na cadeia transportadora de electrões, e compete com NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> pelos electrões.

Quando o INT aceita os electrões é reduzido a um formazão Cloreto de iodonitrotetrazolio (INTF) (**figura 11**) de coloração vermelha e assim a concentração de formazão formado pode ser medido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 490 nm. (Tayler *et al.*, 2002).



**Figura 11** - Reacção enzimática entre o INT e a desidrogenase (adaptado de Taylor *et al.*, 2002).

Esta actividade serve como um indicador dos sistemas redox microbiológicos e pode ser considerado uma boa medida da actividade oxidativa microbiana (Camiña *et al.*, 1998).

A actividade da desidrogenase utilizando o INT como substrato depende do tipo de amostra, do pH, do O<sub>2</sub> e da temperatura (Gong, 1996).

A determinação da carga microbiana pelo método enzimático usando a desidrogenase tem também a vantagem de ser mais rápido que a avaliação da contaminação microbiana por incubação das amostras em meios de cultura.

### 3. Legislação

A esterilização de dispositivos obedece a diversos requisitos legais, quer portugueses quer europeus.

Esta legislação abrange legislação tão diversa como a que se refere:

- ◆ **a sistemas de esterilização:** EN 1422 – Esterilizadores de óxido de etileno, NP EN 550:1994 – Esterilização dos dispositivos médicos – Validação e controlo de rotina do óxido de etileno, EN 556 – Esterilização de Dispositivos médicos rotulados “estéril”;
  - ◆ **a indicadores:** ISO/DIS 14538 – Avaliação Biológica de dispositivos médicos. Estabelecimento de limites para esterilização usando uma avaliação de riscos, EN ISO 14161 – Indicadores biológicos para esterilização de produtos de saúde – Guia para a selecção, uso e interpretação dos resultados, EN ISO 15882 – Indicadores químicos para esterilização de produtos de saúde, EN ISO 11138 – Indicadores Biológicos, EN ISO 10993 – Avaliação Biológica de Dispositivos médicos,
  - ◆ **ao sistema de produção:** EN ISO 11607 – Embalagem de dispositivos médicos sujeitos a esterilização, EN ISO 11607 -1 – Empacotamento, EN ISO 868-2-3-4-5-6-7-8-9 – Material de embalagem em sistemas de dispositivos destinados a serem utilizados, EN ISO 11607-2 – Validação do processo de selagem,
- ou outra, como EN ISO 13485:2004 – Sistemas da Gestão da Qualidade - Requisitos para fins regulamentares, EN 980:2008 – Símbolos gráficos para o uso na rotulagem dos dispositivos médicos, EN ISO 14971 – Aplicação da gestão de risco aos dispositivos médicos ou EN 1041 – Informação a ser cedida pelo fabricante com os dispositivos médicos.

#### ***4. Instalação de uma central de esterilização***

Um planeamento adequado de um centro de esterilização por óxido de etileno pode reduzir sensivelmente a exposição dos operadores a esse gás, caso ocorra alguma fuga. Ventilação adequada, áreas bem definidas, controlo ambiental e procedimentos de segurança podem definir os valores de uma possível exposição do operador. A área de esterilização deve possuir cinco áreas bem definidas:

- ♣ Ambiente de acesso restrito, onde são instalados os pontos de controlo e monitorização do processo de esterilização.
- ♣ Ambiente onde se localiza a câmara de esterilização. O projecto deve ser compatível com o risco de explosão, pois o óxido de etileno é inflamável.

♣ Sala onde existem condições mecânicas ou naturais que permitem a circulação de ar nos dispositivos médicos, visando a eliminação total dos resíduos do gás.

♣ Área destinada apenas ao armazenamento dos recipientes do agente esterilizante. Deve ser bem arejada, isolada de modo a estar protegida das oscilações da temperatura e próxima da área de esterilização (Possari, 2003).

A esterilização por óxido de etileno tornou-se num método seguro e eficaz, fornecendo recursos para a esterilização de um vasto leque de dispositivos médicos, os quais seriam danificados por esterilização através do calor seco ou vapor saturado sob pressão (Possari, 2003). O processo por OE é complexo e requer monitorização constante de modo a garantir a qualidade dos dispositivos médicos. O objectivo da validação da esterilização por OE é torná-la legítima através de registos de tudo o que a envolve, desde condições do ambiente, do equipamento, da carga microbiana, tudo o que estiver envolvido no processo de esterilização (Possari, 2003).

A validação do processo de esterilização inclui a qualificação de processos físicos e microbiológicos, sendo estes descritos em detalhe na norma ISO 11135 e na norma europeia EN 550 (Mendes *et al.*, 2007). No entanto nenhuma destas normas inclui critérios de selecção do processo de esterilização a escolher (Mendes *et al.*, 2007). A variabilidade geométrica dos dispositivos médicos e as características da embalagem são também factores que devem ser considerados num processo de validação (Mendes *et al.*, 2007).

A qualificação física do processo consiste na verificação da reprodutibilidade do ciclo e verificação do impacto que este possui nos dispositivos médicos, assim como verificar a funcionalidade da embalagem (Mendes *et al.*, 2007). A qualificação microbiológica do processo consiste na avaliação da capacidade letal do processo de esterilização (Mendes *et al.*, 2007).

A qualificação do projecto consiste na primeira etapa do processo de esterilização, sendo o objectivo principal verificar se as instalações cumprem todos os requisitos, nomeadamente no que se refere a sistema de ar comprimido, água, energia eléctrica, espaço para o quarto de esterilização e resistência do piso. É também importante considerar os seguintes requisitos:

- Ventilação – a área de instalação deve ser ventilada, sendo necessária uma troca de ar de 25 renovações de ar/hora.
- Água – a operação da bomba de vácuo requer água com pressão adequada para o seu funcionamento. A saída de água deve ser feita por um sistema de sifão de modo a evitar o retorno de água para o equipamento (Possari, 2003).

A qualificação da instalação constitui a segunda fase do processo de validação, na qual o destaque dá-se à montagem da instalação, ou seja, se ela foi realizada de acordo com o projecto já qualificado. Entre os principais testes realizados nesta fase estão a estanqueidade dos chuveiros e tubagens hidráulicas e o controlo da corrente da rede eléctrica e das renovações de ar. Deve-se verificar também a caixa de borbulhamento, zona de armazenamento dos tanques de óxido de etileno, rede de vapor, sistema de suporte. Quanto ao equipamento, a qualificação da instalação consiste em verificar se ele está apto para utilização por meio de testes eléctricos, electrónicos e mecânicos (Possari, 2003).

Na qualificação da operação, o objectivo é verificar se os parâmetros do processo de esterilização estão a ser respeitados pelo equipamento. Os parâmetros físicos investigam a integridade da câmara da autoclave, ou seja, a capacidade física da máquina para evacuar o ar da câmara e da carga, a capacidade de manter a temperatura necessária uniformemente em toda a carga com a adição do OE, a pressão, a concentração, a distribuição e a penetração do OE e, por fim, a humidade relativa. Os testes de desempenho do equipamento envolvem a observação de todos estes parâmetros durante o processo de esterilização (Possari, 2003).

A qualificação do desempenho é realizada por meio de sucessivas esterilizações, às quais se submete um mesmo número de dispositivos médicos e o mesmo número de microrganismos conhecidos aos parâmetros (tempo, temperatura, concentração do gás, humidade relativa) especificados pelo fabricante. O objectivo, também aqui, consiste em verificar a eficácia do processo de esterilização (Possari, 2003).

Para a qualificação microbiológica existem três tipos de abordagem que são, por ordem decrescente de utilização: método de *overkill*, método biológico combinado indicador/*bioburden* e método *bioburden* (Mendes *et al.*, 2007).

A abordagem *overkill* utiliza dados do indicador biológico para avaliar a taxa microbiológica de um determinado processo. A definição do processo com base na combinação entre o indicador e/ou método de *bioburden* define as medidas necessárias para atingir a esterilidade do processo (Mendes *et al.*, 2007).

O método *bioburden* é um processo definido com base na inactivação da população microbiana no seu estado natural. O método *overkill* é aplicável ao longo da combinação ( $10^6$  microrganismos de *Bacillus subtilis*, reclassificado em 2001 por Fritze e Rudiger como *B. atropheus*) (Mendes *et al.*, 2007) e a resistência do indicador, expresso em valor D que excede a biocarga do produto. O processo de esterilização

definido com base nesta abordagem é muitas vezes conservador, porque os parâmetros do ciclo de esterilização necessários para esterilizar a biocarga são superiores à necessidade. A determinação do ciclo de letalidade consiste na determinação do tempo mínimo de exposição em que existe sobrevivência (Mendes *et al.*, 2007).

## *Capítulo II*

---

### *Problemática e Objectivos*

## **II. Problemática e objetivos**

### **1. Problemática**

Os dispositivos médicos são importantes instrumentos de saúde, que englobam um vasto conjunto de produtos. São destinados, na prática médica, a terem diversos usos, incluindo fins comuns aos dos medicamentos, tais como prevenir, diagnosticar ou tratar uma doença humana ([www.infarmed.pt](http://www.infarmed.pt), 2010).

Dependendo do seu uso e do estado de esterilização, os dispositivos médicos podem constituir um foco de contaminação para o paciente e um factor de morbilidade acrescido se não estiverem devidamente esterilizados ([www.sterigenics.com](http://www.sterigenics.com), 2010). Assim, é de vital importância que quaisquer processos de esterilização a que sejam sujeitos sejam compatíveis com os materiais de que são fabricados, a sua embalagem e a carga contaminante que possuem. Diversas propriedades do óxido de etileno, incluindo a sua utilização em materiais termossensíveis e a sua elevada penetração em dispositivos médicos embalados, fazem deste composto um dos melhores agentes de esterilização para dispositivos médicos, com uma capacidade letal elevada, até  $10^6$  células ([www.sterigenics.com](http://www.sterigenics.com), 2010).

Para um bom desempenho do processo de esterilização devem ser controladas todas as fases inerentes ao processo de fabrico dos dispositivos médicos, nomeadamente, a qualidade do ar das salas de fabrico, as superfícies, os manipuladores, a matéria-prima e o produto semi-acabado. Estas fases de produção têm influência na carga contaminante dos dispositivos médicos, a qual determinará as variáveis associadas ao processo de esterilização como o tempo de esterilização, a temperatura, a pressão e a humidade.

Assim, os conhecimentos das cargas contaminantes dos diversos dispositivos, a sua relação com as diversas fases de fabrico e armazenamento, são essenciais na implementação de um sistema de esterilização. Também, escolhido o agente de esterilização, importa saber se este apresenta a capacidade letal enunciada quando utilizado nos dispositivos médicos e embalagens, específicos da empresa que se propõe implementar este sistema de esterilização.

## **2. Objectivos**

O presente trabalho de investigação tem como principal objectivo o estudo dos factores que condicionam a esterilização de dispositivos médicos, utilizando como agente esterilizante o óxido de etileno.

Deste modo pretende-se:

- Conhecer os microrganismos e as cargas microbianas nas várias etapas da produção, incluindo: manipuladores, superfícies, ar, matéria-prima e produto acabado antes da esterilização;
- Avaliar a proliferação da carga microbiana durante o tempo de armazenamento;
- Avaliar a eficácia do óxido de etileno na esterilização dos diferentes dispositivos médicos com cargas contaminantes conhecidas, de bactérias e fungos;
- Avaliar a eficácia da esterilização para diferentes níveis de contaminação;
- Determinar a carga microbiana por intermédio de um método enzimático;

*Capítulo III*

---

*Parte Experimental*

### **III – Parte experimental**

Para a realização deste trabalho foram efectuados dois estudos em paralelo, um dos quais foi realizado dentro da empresa, cujo objectivo foi a avaliação da carga microbiana existente a nível de manipuladores, superfícies, ar, matéria-prima e produto acabado e, simultaneamente, foi realizado um estudo em laboratório utilizando-se microrganismos e níveis de contaminação conhecidos.

#### **1 – Metodologias utilizadas para determinação da carga microbiana nas etapas de produção**

##### **1.1 – Determinação da carga microbiana no ar**

De acordo com o anexo C da EN ISO 14698-1:2003, foram analisadas 21 amostras, recolhidas em diferentes locais, considerando-se duas situações: recolha em fase de produção e na ausência de produção da fábrica.

As amostras foram recolhidas por filtração de ar, num volume equivalente a 1m<sup>3</sup>, sendo este recolhido directamente para as placas com os respectivos meios de cultura: *Plate Count Agar* (PCA) para contagem de microrganismos a 30°C e *Sabouraud gentamicina chloramphenicol* (SGC2) para contagem de fungos filamentosos e leveduras. A **figura 12** mostra o equipamento de recolha de ar.

Para a contagem de microrganismos a 30°C, as placas foram a incubar a 30°C durante 3 a 7 dias e para contagem de fungos filamentosos e leveduras as placas foram a incubar a 25°C durante 5 a 7 dias. Após o tempo de incubação contaram-se todas as colónias existentes nas placas.



**Figura 12** – Aparelho para recolha de amostras de ar (fonte: Catálogo da Merck)

## **1.2 – Determinação da carga microbiana em superfícies**

Foi realizada a recolha de amostras em nove superfícies de trabalho, usando a metodologia definida no anexo C da EN ISO 14698-1:2003.

As amostras foram recolhidas através do contacto directo da gelose com a superfície, incubando-se a 20-25 °C durante 5 a 7 dias, em meio de cultura SGC2, e a 30-35 °C durante 3 a 7 dias em meio de cultura PCA.

Após o tempo de incubação foram contadas as colónias existentes nas placas.

## **1.3 – Determinação da carga microbiana em manipuladores**

Dada a importância da contaminação pelos manipuladores, a legislação obriga ao controlo da contaminação dos manipuladores. De acordo com o anexo D da EN ISO 14698-1:2003, devem ser controlados os seguintes pontos: mãos, axila direita, axila esquerda, touca e botões da bata, de forma a controlar-se a higiene das mãos e fardamento. Assim, realizou-se a recolha de amostras em 9 manipuladores, sendo as mesmas recolhidas em diferentes épocas do ano (fase do ano em que as temperaturas são mais quentes e fase do ano em que as temperaturas são mais baixas).

Para a recolha das amostras utilizou-se uma zaragatoa, humedecida com água peptonada tamponada, passando-se depois com a mesma sobre as superfícies a analisar. As amostras foram inoculadas em PCA e em SGC2, a 30-35 °C para contagem de microrganismos a 30 °C, e a 20-25 °C para contagem de *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.* Após o tempo de incubação, contaram-se todas as colónias existentes nas placas.

## **1.4 – Determinação da carga microbiana em matéria-prima e produto não estéril (produto semi-acabado)**

A metodologia utilizada foi definida de acordo com a Farmacopeia Portuguesa, edição VIII e a EN ISO 11737-1:2006. Colocou-se a amostra dentro de um saco estéril em 1 L de água peptonada tamponada, agitando-se durante 30 minutos. Em seguida filtrou-se a amostra e colocou-se o filtro em meio PCA, incubando-se a 30-35 °C durante 3 a 7 dias. Para a detecção de fungos filamentosos e leveduras, o filtro foi colocado em meio SGC2 e incubado a 20-25 °C durante 5 a 7 dias. Após o período de incubação foram contadas as colónias das placas que apresentavam o maior número de ufc/g.

## **2 – Ensaio realizados em condições controladas**

Para se estudar a proliferação dos microrganismos ao longo do tempo, utilizaram-se duas estirpes diferentes, uma correspondente a um fungo filamentosos, *Trichoderma reesei* e outra correspondente a uma bactéria, *Escherichia coli*. Prepararam-se culturas em rampa, sendo estas utilizadas para a contaminação dos diversos tipos de material a estudar: gaze, não tecido, plástico e metal. As amostras foram analisadas após a contaminação: tempo zero, após um dia, uma semana (7 dias), duas semanas (14 dias) e quatro semanas (28 dias), no que respeita ao número total de células viáveis.

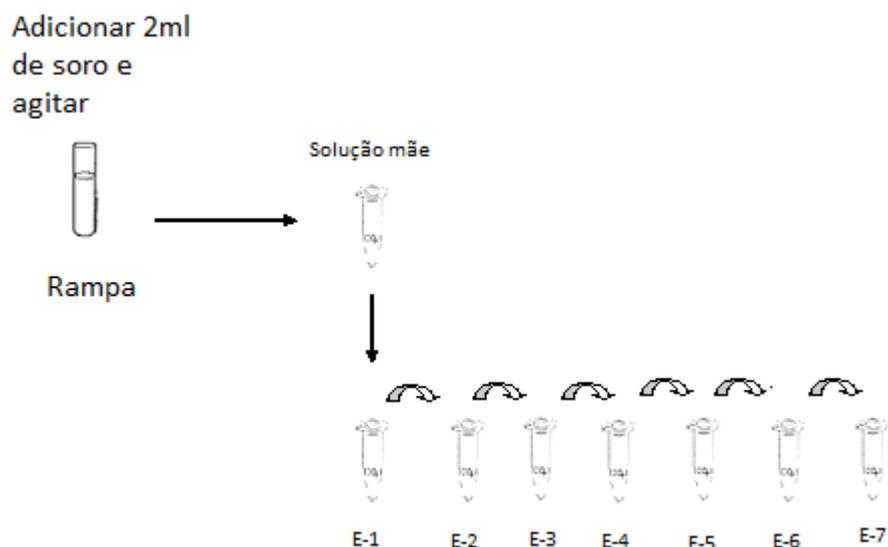
### **2.1 – Avaliação da contaminação com *Trichoderma reesei***

#### **2.1.1 – Preparação das culturas e contaminação dos dispositivos médicos com *Trichoderma reesei***

Para a realização deste ensaio utilizaram-se dispositivos médicos esterilizados, pois pretende-se saber se a carga microbiana aumenta ou diminui ao longo do tempo de armazenamento.

Prepararam-se várias rampas com culturas de *Trichoderma reesei*, incubando-se a 28 °C durante 5 dias. Após este período para a contaminação dos dispositivos médicos preparou-se uma suspensão de células de *Trichoderma reesei* colocando-se 2 mL de soro fisiológico no tubo de ensaio e com o auxílio de uma ansa removeram-se as células existentes na superfície do meio de cultura.

A suspensão foi homogeneizada e prepararam-se várias diluições de 1/10, até à diluição  $10^{-7}$  (a **figura 13** esquematiza a metodologia utilizada). Para se conhecer o número de células existentes em cada diluição, procedeu-se à contagem em microscópio, sendo utilizada a câmara de Neubauer.



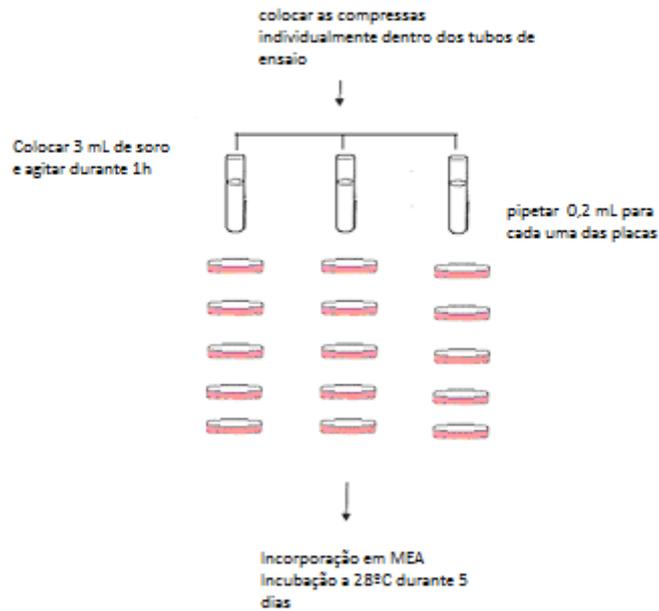
**Figura 13** – Esquema da preparação das soluções para contaminação

Com o auxílio de uma micropipeta, aplicou-se de 1 ml de solução em toda a extensão de cada dispositivo médico, tendo sido preparadas 3 amostras para cada um dos tempos a analisar. Após contaminação, cada tipo de material foi armazenado à temperatura ambiente.

## **2.1.2 – Avaliação da contaminação dos dispositivos médicos por *Trichoderma reesei***

### **2.1.2.1 – Compressas de gaze e não tecido**

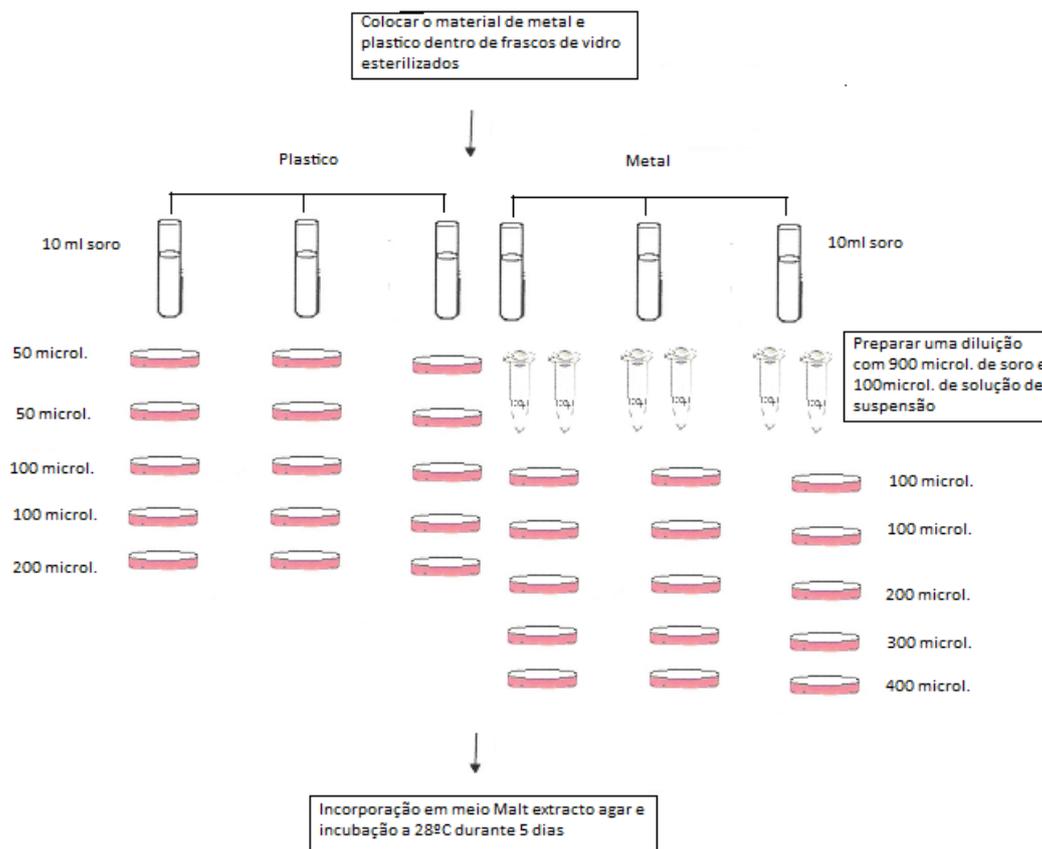
As compressas contaminadas como *Trichoderma reesei* foram colocadas num tubo de ensaio e adicionados 3 mL, e agitado durante 1 hora. Após agitação, pipetou-se 0,2 mL de cada uma das amostras para 5 placas de Petri, incorporando-se em Malt extract agar (MEA), incubando-se a 28°C durante 5 dias (**figura 14**). Após incubação, procedeu-se à contagem das colónias que apresentavam coloração verde e rebordo amarelo, sendo os resultados expressos como unidades formadoras de colónias (ufc) por grama de material.



**Figura 14** – Metodologia utilizada para análise das compressas de gaze e não tecido

### 2.1.2.2 – Plástico e Metal

Aos dispositivos em plástico e metal contaminados com *Trichoderma reesei* foram adicionados 10 mL de soro fisiológico a cada um dos frascos, agitando-se durante 1 hora. Após agitação pipetaram-se diferentes quantidades de amostra para cada uma das placas de Petri (**figura 15**). Para cada uma das amostras preparou-se 5 placas de Petri, incorporou-se em Malt extract agar (MEA), incubando-se a 28 °C durante 5 dias. Após incubação, procedeu-se à contagem das colónias que apresentavam coloração verde e rebordo amarelo, sendo os resultados expressos como unidades formadoras de colónias (ufc) por grama de material.

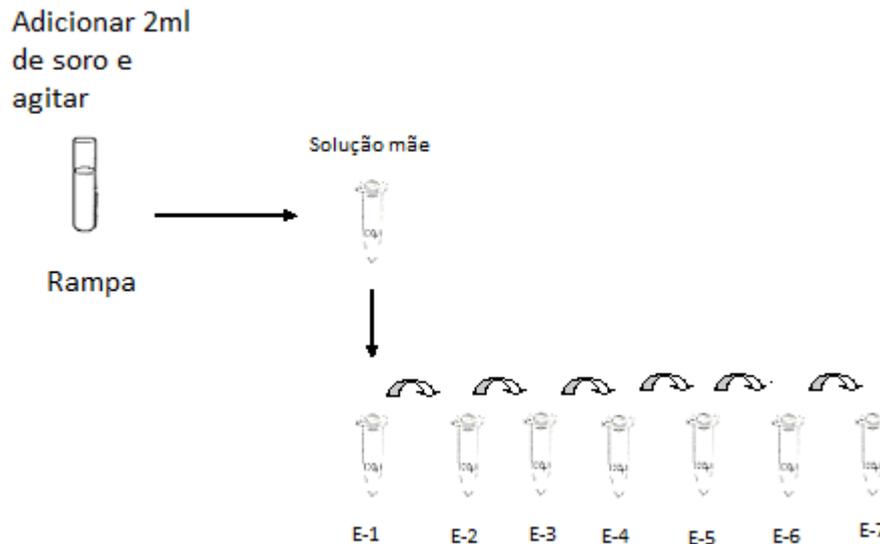


**Figura 15** - Metodologia utilizada para avaliação dos dispositivos médicos em plástico e metal contaminados com *Trichoderma reesei*

## 2.2 - Avaliação da contaminação com *Escherichia coli*

### 2.2.1 – Preparação das culturas e contaminação dos dispositivos médicos com *Escherichia coli*

Para a realização deste ensaio utilizaram-se dispositivos médicos esterilizados. Prepararam-se várias rampas com culturas puras de *Escherichia coli*, incubando-se a 37°C durante 24-48 horas. Para a contaminação dos dispositivos médicos colocaram-se 2mL de soro fisiológico dentro do tubo de ensaio. Com o auxílio de uma ansa removeram-se as células existentes na superfície do meio de cultura, homogeneizando-se a suspensão. Prepararam-se várias diluições de 1/10, até à diluição  $10^{-7}$  (a **figura 16** esquematiza a metodologia utilizada). Para se conhecer o número de células existentes em cada diluição, procedeu-se à contagem em microscópio, sendo utilizada a câmara de Neubauer.



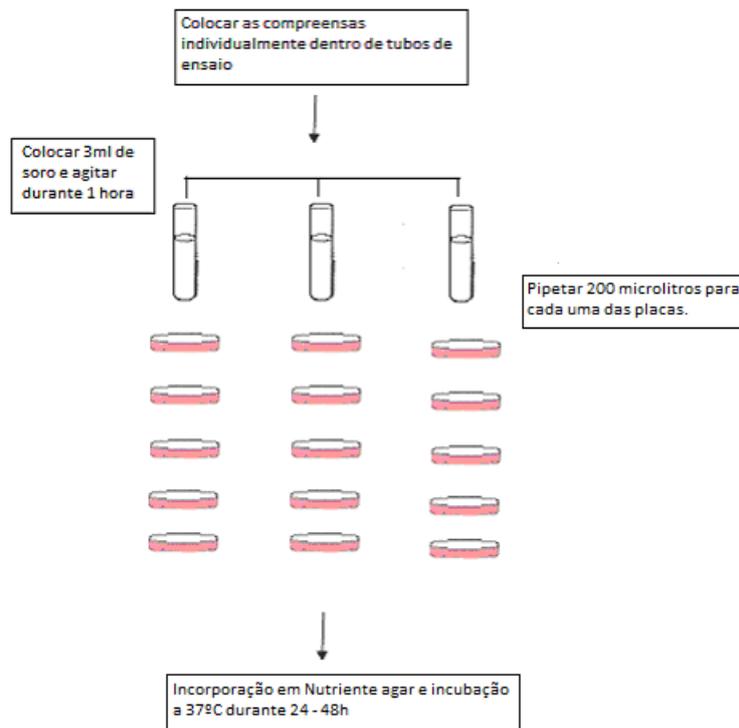
**Figura 16** – Preparação das suspensões de *Escherichia coli* com diferentes concentrações

Com o auxílio de uma micropipeta, aplicou-se de forma homogênea 1 mL de solução em cada dispositivo médico. Foram preparadas 3 amostras para cada um dos tempos a analisar. Após contaminação, os dispositivos foram armazenados à temperatura ambiente.

## **2.2.2 – Avaliação dos dispositivos médicos por *Escherichia coli***

### **2.2.2.1 – Compressas de gaze e não tecido**

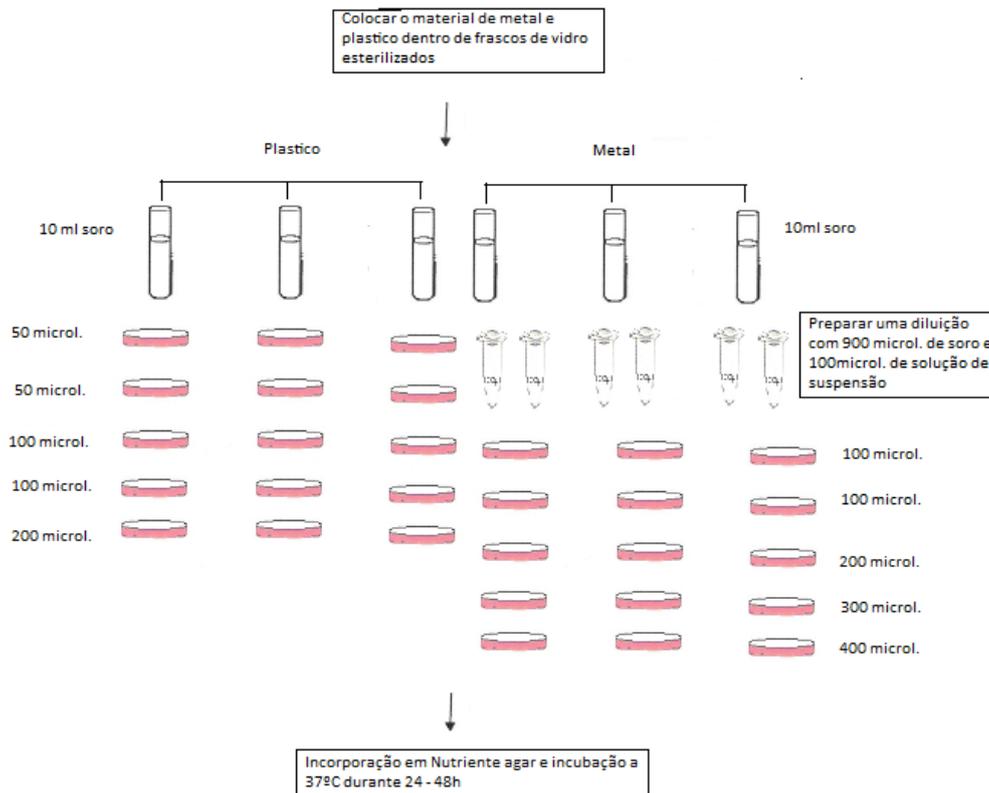
Adicionou-se 3 mL de soro a cada um dos tubos contendo as compressas, agitando-se durante 1 hora. Após agitação pipetou-se 0,2 mL de cada uma das amostras para as placas de Petri. Para cada uma das amostras preparou-se 5 placas de Petri, incorporou-se em nutriente agar, incubando-se a 37°C durante 24 a 48 horas (**figura 17**). Após incubação, procedeu-se à contagem das colônias que apresentavam coloração amarela, forma circular e diâmetro entre 2 a 3 mm (**figura 17**), sendo os resultados expressos como unidades formadoras de colônias (ufc) por grama de material.



**Figura 17** – Metodologia utilizada para avaliação dos dispositivos médicos em gaze e não tecido contaminados com *Escherichia coli*

### 2.2.2.2 – Plástico e Metal

Para os dispositivos médicos em plástico e metal, adicionou-se 10 mL de soro fisiológico a cada um dos frascos contendo os dispositivos, agitando-se durante 1 hora. Após agitação pipetaram-se diferentes quantidades de amostra para cada uma das placas de Petri. Para cada uma das amostras preparou-se 5 placas de Petri, incorporou-se em Nutriente agar, incubando-se a 37°C durante 24 a 48 horas. Após incubação, procedeu-se à contagem das colónias que apresentavam coloração amarela, forma circular e diâmetro entre 2 a 3 mm, sendo os resultados expressos como unidades formadoras de colónias (ufc) por grama de material (**figura 18**).



**Figura 18** – Metodologia utilizada para avaliação dos dispositivos médicos em plástico e metal contaminados com *Escherichia coli*

### **3 – Avaliação da contaminação microbiana ao longo do tempo de armazenamento**

Para a realização deste ensaio o produto foi embalado na linha de produção da empresa, sendo utilizado o mesmo papel e o mesmo filme de embalagem. Os tempos de armazenamento foram iguais aos dos ensaios realizados em condições controladas. As embalagens dos dispositivos médicos foram abertas em condições assépticas e foram tratadas de acordo com a metodologia descrita nos pontos 2.1 e 2.2, tendo-se avaliado a contaminação por bactérias, em meio Nutriente agar, e por fungos filamentosos e leveduras em MEA.

#### **4 – Ensaio de esterilidade**

Os dispositivos foram contaminados com carga de  $10^3$  até  $10^8$ , de modo a verificar-se se para níveis de contaminação mais elevados, o óxido de etileno ainda tem capacidade de esterilização, uma vez que são os que apresentam uma maior carga microbiana. O ensaio de esterilidade foi realizado apenas nas compressas de gaze e não tecido. A metodologia utilizada foi a mesma descrita nos pontos 2.1 e 2.2.

#### **5 – Ensaio enzimáticos**

Os ensaios enzimáticos são hoje bastante utilizados na determinação da actividade metabólica (Warscheid *et al.* 1990), sendo referidos na bibliografia, como indicadores da presença e/ou da actividade dos microrganismos nos ecossistemas que colonizam (Pankhurst *et al.* 1997). Neste trabalho utilizou-se a determinação da actividade da enzima desidrogenase como indicador de presença de microrganismos.

A determinação da actividade enzimática de desidrogenases foram efectuadas de acordo com o método descrito por Camiña (1998), utilizando como substrato o cloreto de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT). Na presença do enzima desidrogenase ocorre a remoção do hidrogénio do substrato formando-se o sal de tetrazolio. Este é reduzido formando-se assim o formazão correspondente, ou seja, o cloreto de idonitrotetrazolio (INTF) (Taylor *et al.*, 2002). O formazão derivado da redução do INT apresenta coloração vermelha e é detectado espectrofotometricamente a 490 nm, sendo que a quantidade de produto formado é proporcional à actividade da desidrogenase (Camiña *et al.*, 1998).

Para determinar a actividade da desidrogenase adicionou-se 750  $\mu$ L de suspensão (*Trichoderma reesei*, com concentração  $31 \times 10^6$  ufc/g), 0,75  $\text{cm}^3$  de tampão Tris-HCl pH 7,5 (1 M) e 1,0  $\text{cm}^3$  de INT 0,5% em solução aquosas de DMF a 20%. A suspensão obtida incubou-se em banho-maria, com agitação, a 40°C durante 1 hora ao abrigo da luz. Adicionou-se 4,0 mL da mistura de etanol-DMF (1:1) e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , agitando-se, facilitando assim a homogeneização da solução. O INTF formado foi quantificado num espectrofotómetro de ultravioleta - visível a um comprimento de onda de 490 nm.

Para a quantificação da actividade enzimática procedeu-se à construção de uma curva de calibração com INTF no intervalo de concentrações entre 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e 40  $\mu\text{g/mL}$  de INTF.

As leituras dos padrões e das amostras foram efectuadas em triplicado. A concentração de INTF formado num ensaio de desidrogenase foi calculada por interpolação da curva de calibração.

## **6 – Validação estatística dos resultados**

Na validação estatística dos resultados da carga microbiana (fungo, bactéria e armazenamento) utilizou-se o programa SPSS para o Windows, versão 15. Consideraram-se as médias como variáveis dependentes e os tempos de armazenamento como variáveis independentes.

As diferenças encontradas nas médias foram estudadas recorrendo ao teste de análise de variância (ANOVA). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Levene e a comparação múltipla das médias foi realizada com o teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

## *Capítulo IV*

---

### *Resultados e Discussão*

#### 4.1. Carga microbiana existente no ar

A embalagem dos dispositivos médicos realiza-se em salas apropriadas, designadas por salas classificadas ou salas limpas, com controlo de temperatura, pressão de ar e humidade. Segundo a norma EN ISO 14698:2003, é necessário efectuar-se um controlo de qualidade ao ar, uma vez que podem ocorrer dois tipos de contaminação: contaminação externa, através do sistema de ar condicionado e portas, e contaminação interna, provocada pelos manipuladores, pelo desgaste de superfícies e equipamentos e pelo processo de fabrico em geral.

Para analisar a carga microbiana existente no ar, foram efectuadas recolhas de ar em diferentes locais de produção, considerando que existem 4 zonas afectas à produção: antecâmara 1 (zona de preparação de matéria-prima onde se retira a primeira embalagem); antecâmara 2 (zona de preparação de matéria-prima onde se retira a segunda embalagem); antecâmara 3 (entrada e saída de manipuladores) e sala classificada (zona de embalagem dos dispositivos médicos), (figura 19).



Figura 19 - Zonas afectas à área de produção

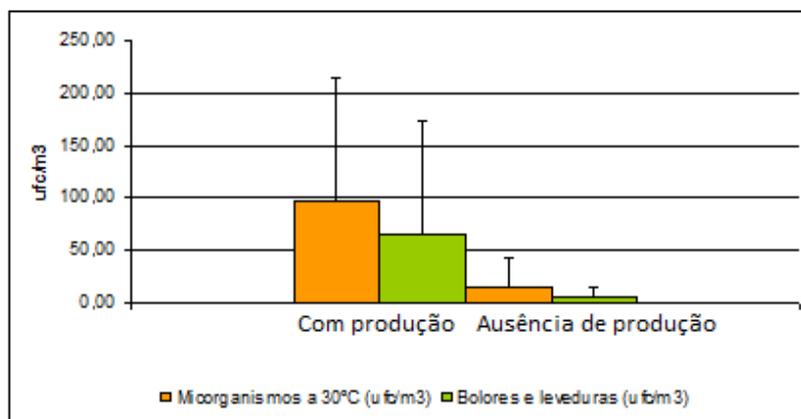
As amostras foram recolhidas em locais diferentes, considerando-se duas situações diferentes: recolha em fase de produção e em ausência de produção. Nestas amostras foi avaliada a contaminação por microrganismos a 30°C e por fungos, de acordo com a legislação aplicável a áreas de produção de dispositivos médicos. A **tabela 3** apresenta os resultados da carga microbiana existente no ar durante estes períodos, no que respeita a microrganismos a 30°C (ufc/m<sup>3</sup>) e a fungos (fungos filamentosos e fungos unicelulares) (ufc/m<sup>3</sup>).

**Tabela 3** - Carga microbiana existente no ar em períodos de produção e em ausência de produção

<b>Carga microbiana existente no ar</b>				
<b>Locais de recolha</b>	<b>Durante a produção</b>		<b>Ausência de produção</b>	
	<b>Microrganismos a 30 °C (ufc/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Fungos Filamentosos e leveduras (ufc/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Microrganismos a 30 °C (ufc/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Fungos Filamentosos e leveduras (ufc/m<sup>3</sup>)</b>
Antecâmara 1	329	101	100	36
	329	372	46	12
	224	329	8	2
Antecâmara 3	40	60	20	34
	0	0	88	8
	0	0	22	6
Antecâmara 2	183	60	3	1
	224	121	5	1
	203	183	8	1
	245	80	5	1
Sala classificada	60	40	4	1
	0	20	3	1
	0	0	1	1
	0	0	1	1
	0	0	2	1
	20	0	3	1
	20	20	1	1
	20	0	1	1
	0	0	1	1
	142	0	1	1
0	0	1	1	
<b>Média</b>	97,10	66,00	15,43	5,38
<b>Desvio padrão</b>	118,35	107,12	28,26	10,26

O nível de carga microbiana foi mais elevado durante o período de fabrico como mostra a **figura 20**. Para microrganismos a 30 °C, durante a produção, obteve-se uma média de 97,10 ufc/m<sup>3</sup>, enquanto que na ausência de produção obteve-se apenas 15,43 ufc/m<sup>3</sup>. Comparando-se os valores individuais das salas, verifica-se que a sala mais contaminada é a antecâmara 1, seguida da antecâmara 2, tal como esperado,

uma vez que estas salas são, em fase de produção, as salas de abertura das embalagens que contêm a matéria-prima. Quanto maior o fluxo de produção, maior será o volume de cartões a passar por estas salas, influenciando assim o nível de contaminação microbiana.



**Figura 20** – Valores médios de contaminação microbiana do ar em períodos de produção e em ausência de produção

Para os fungos (fungos filamentosos e leveduras), durante a produção foi obtido um valor de média de  $66,0 \text{ ufc/m}^3$ , enquanto que num período sem produção este valor baixou para  $5,38 \text{ ufc/m}^3$ . Comparando-se os valores individuais para cada sala, verificou-se que a antecâmara 1 foi a que apresentou valores mais elevados, seguida da antecâmara 2.

A carga microbiana existente no ar relativa a fungos é menor que a correspondente carga relativa aos microrganismos a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , seja em fase de produção ou na sua ausência.

A antecâmara 3 foi a que apresentou valores de contaminação mais elevados na ausência de produção, quer para microrganismos a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , quer para fungos filamentosos e leveduras.

Nos valores obtidos existe uma diferença muito grande entre os valores da carga microbiana, com valores de desvios padrões muito grandes, o que demonstra uma heterogeneidade entre a contaminação microbiana do ar nas diversas salas afectas à produção. Esta variação dos resultados pode estar relacionada com a diferença que existe entre as salas e com o tipo de manipulação associado a cada sala.

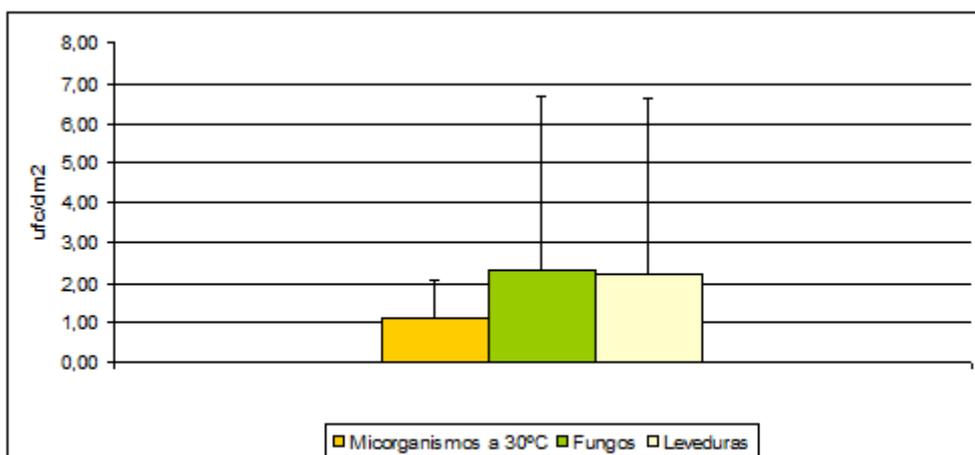
#### 4.2. Carga microbiana existente nas superfícies

Para se avaliar as condições higiénicas da zona de produção, foram retiradas amostras aleatórias em nove superfícies diferentes. Nesta análise, foram avaliadas as cargas microbianas em microrganismos a 30°C, fungos filamentosos e leveduras, de acordo com o exigido pela legislação ([www.infarmed.pt](http://www.infarmed.pt)). A **tabela 4** mostra os valores obtidos. Estes resultados mostram uma carga microbiana baixa e generalizada para os microrganismos a 30°C, enquanto a contaminação por fungos é restrita a apenas algumas superfícies, mais irregulares, como é o caso das superfícies 5 e 6, que correspondem a manípulos das portas. As restantes superfícies, lisas (superfícies das máquinas e paredes) apresentam valores muito baixos, uma vez que são superfícies de fácil higienização.

No fabrico e embalagem de dispositivos médicos é importante o controlo microbiológico de superfícies, de modo a garantir que o produto não é contaminado. Os resultados obtidos (**figura 21**) mostram uma carga microbiana baixa que indica que existe uma rotina de limpeza e que esta é eficaz.

**Tabela 4** - Carga microbiana existente nas superfícies

<b>Superfícies</b>			
<b>Nº da amostra</b>	<b>Microrganismos a 30°C (ufc/dm<sup>2</sup>)</b>	<b>Fungos Filamentosos (ufc/dm<sup>2</sup>)</b>	<b>Leveduras (ufc/dm<sup>2</sup>)</b>
Superfície 1	3	0	0
Superfície 2	0	0	0
Superfície 3	1	1	0
Superfície 4	2	0	0
Superfície 5	1	10	10
Superfície 6	1	10	10
Superfície 7	1	0	0
Superfície 8	1	0	0
Superfície 9	0	0	0
<b>Média</b>	1,11	2,33	2,22
<b>Desvio Padrão</b>	0,93	4,36	4,41



**Figura 21** – Valores médios de contaminação microbiana em superfícies

### **4.3. Contaminação existente nos manipuladores**

Os dispositivos médicos podem ser utilizados na sua vertente estéril, quer na sua vertente não estéril. Durante o processo de fabrico e embalagem, são vários os factores que devem ser controlados de forma a reduzirem os riscos de contaminação. Uma deficiente higienização por parte dos manipuladores pode constituir um risco, ou seja, pode ocasionar uma contaminação nos dispositivos médicos, colocando em risco a saúde e bem-estar de um doente. Os manipuladores são considerados um dos principais focos de contaminação, mesmo os manipuladores sadios podem ser portadores de bactérias que podem contaminar os dispositivos médicos, através da boca, nariz, garganta e tracto intestinal. As mãos podem conter vários microrganismos importantes como a *Escherichia coli*, que indica contaminação fecal, *Staphylococcus aureus*, que indica a presença de material nasal, e microrganismos a 30 °C, que fazem parte da microflora natural da pele mas que também podem indicar uma má higienização das mãos obrigando assim o manipuladores a desinfectar mais vezes as mãos, sobretudo na estação mais quente do ano.

A legislação (EN ISO 14698-1, 2) obriga à avaliação da carga microbiana dos manipuladores, especificando a análise da carga microbiana em microrganismos a 30°C e *Escherichia. coli* e *Staphylococcus sp*, em diversas partes do manipulador: botões, axilas direita e esquerda, touca, botões e mãos.

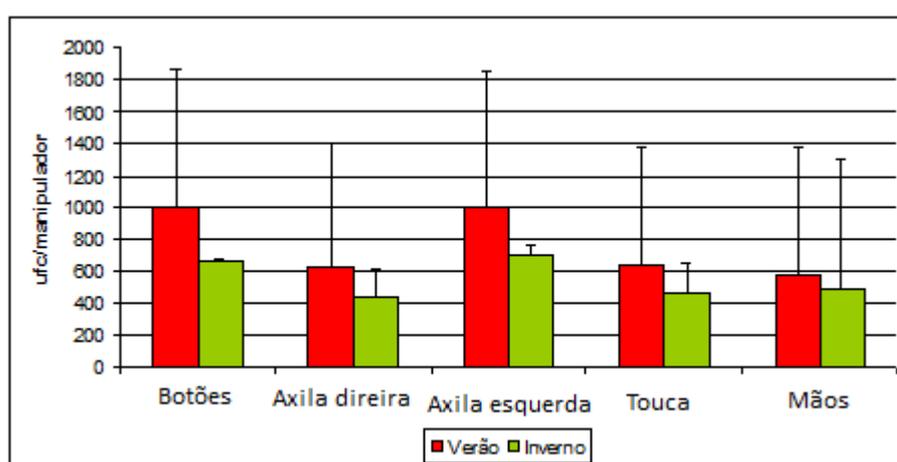
Para efectuar esta avaliação, foram retiradas amostras aos nove manipuladores, tendo seis amostras sido recolhidas no pico da estação fria (Inverno) e três no pico da estação quente do ano (Verão). Os valores obtidos estão apresentados na **tabela 5**.

Os valores obtidos mostram que os microrganismos a 30 °C encontram-se em maior quantidade na estação quente, sendo o valor máximo de 1500 ufc/manipulador (**figura 22**). Na estação fria observa-se um valor de 2200 ufc/manipulador, mas os demais valores não ultrapassam 460 ufc/manipulador.

De realçar que não se observou qualquer contaminação por *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.*

**Tabela 5** – Carga microbiana existente nos manipuladores em diferentes condições ambientais

Carga microbiana nos manipuladores											
Amos.	Microrganismos a 30°C					<i>E. coli / Staphylococcus sp</i>					
	Botões	Axila direita	Axila esquerda	Touca	Mãos	Botões	Axila direita	Axila esquerda	Touca	Mãos	
1	10	10	2	400	2200	0	0	0	0	0	Inverno
2	5	460	100	400	440	0	0	0	0	0	
3	1	3	1	360	270	0	0	0	0	0	
4	5	2	1	7	100	0	0	0	0	0	
5	4	31	52	160	350	0	0	0	0	0	
6	1	9	150	14	6	0	0	0	0	0	
7	1500	1500	15	165	5	0	0	0	0	0	Verão
8	0	350	1500	260	1500	0	0	0	0	0	
9	1500	40	1500	1500	240	0	0	0	0	0	
Média	336,2	267,2	369,0	362,9	567,9	0	0	0	0	0	
Desvio Padrão	659,8	493,0	643,2	452,1	761,9	0	0	0	0	0	



**Figura 22** – Valores médios de ufc/ manipulador de microrganismos a 30 °C

Comparando os diversos pontos de recolha das amostras, as mãos foram as que apresentaram valores mais elevados, com uma média de 567,9 ufc/manipulador. Os

botões da bata apresentaram uma média de 336,2 ufc/manipulador e a touca 362,9 ufc/manipulador. Comparando as axilas, a axila esquerda foi a que apresentou valores mais elevados, com uma média de 369,0 ufc/manipulador para 267,2 ufc/manipulador da axila direita.

Analisando-se os valores individualmente, comparando os valores obtidos no Verão e Invernos (**figura 22**), verifica-se que os valores são mais elevados na estação mais quente em todos os pontos de recolha, enquanto que na estação mais fria esses valores baixaram, principalmente nos botões, axilas e touca.

Também nestes valores, os desvios padrão são muito elevados, uma vez que se tratam de valores obtidos em diferentes condições meteorológicas e em diferentes manipuladores, com hábitos de higiene diferentes.

#### **4.4. Carga microbiana existente na matéria-prima**

A matéria-prima utilizada não é estéril e, dependendo do tipo de microrganismos presentes, pode causar infecção no paciente. A presença de microrganismos (bactérias e fungos) é permitida por lei (EN ISO 11737-1) desde que dentro de limites especificados.

A qualidade da matéria-prima influencia a qualidade do produto final. Um dispositivo médico que seja originário de matéria-prima com um nível de carga microbiana muito elevado pode por em causa toda uma carga de esterilização. Por isso, é importante controlar-se a carga microbiana da matéria-prima. Os microrganismos, de maneira geral, exigem condições favoráveis ao seu crescimento, o que torna algumas matérias-primas mais susceptíveis que outras ao desenvolvimento microbiano. Para se ter a noção do nível de contaminação dos diversos materiais dos dispositivos médicos, foram analisados quatro tipos de matéria-prima: gaze, não tecido, material em plástico e material em metal (**figura 23**).



Figura 23 – Matéria-prima analisada

Relativamente a microrganismos a 30 °C, a gaze foi o material que apresentou mais unidades formadoras de colónia por grama de material, seguida do material em não tecido (**tabela 6**). O material em metal apresenta valores mais elevados comparativamente com o material em plástico (**tabela 6**).

Das 5 amostras analisadas para cada um dos diferentes produtos verificou-se que as compressas de gaze, para microrganismos a 30 °C, apresentaram a maior carga microbiana, com uma média de 14,2 ufc/g, contrariamente ao material em plástico em que se obteve apenas 4,2 ufc/g.

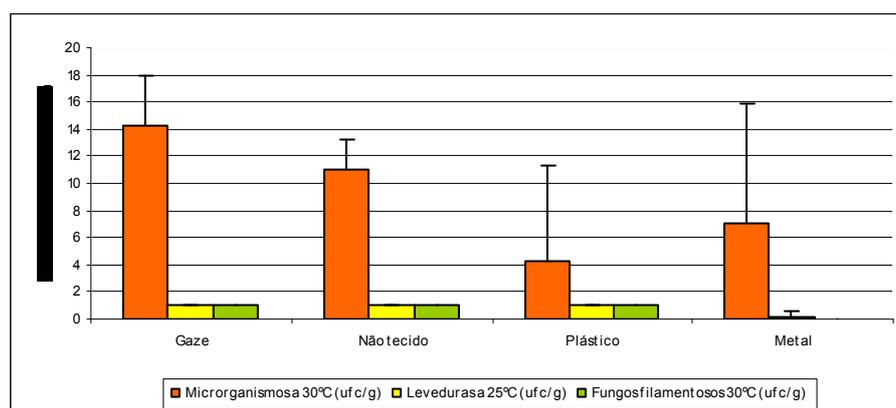
**Tabela 6** – Contaminação microbiana existente na matéria-prima de gaze e não tecido

Nº de amostra	Material de gaze			Material em não tecido		
	Microrganismos a 30 °C (ufc/g)	Leveduras a 25 °C (ufc/g)	Fungos filamentosos a 25 °C (ufc/g)	Microrganismos a 30 °C (ufc/g)	Leveduras a 25 °C (ufc/g)	Fungos filamentosos a 25 °C (ufc/g)
1	10	1	1	10	1	1
2	20	1	1	10	1	1
3	15	1	1	10	1	1
4	12	1	1	10	1	1
5	14	1	1	15	1	1
Média	14,2	1	1	11	1	1
Desvio Padrão	3,77	0,00	0,00	2,24	0,00	0,00

Os fungos filamentosos e as leveduras apresentaram apenas o valor máximo de 1 ufc/g de material, valor muito mais baixo que os valores da carga microbiana em microrganismos a 30 °C (**tabela 6 e 7**). Para fungos filamentosos e leveduras, os valores obtidos foram homogéneos tendo-se obtido uma média de 1 ufc/g, excepto no metal em que não houve crescimento de fungos filamentosos (**figura 24**).

**Tabela 7** – Contaminação microbiana existente na matéria-prima de plástico e metal

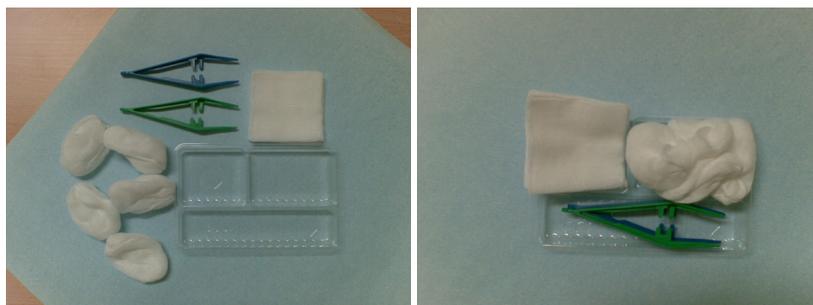
Material em plástico				Material em metal		
Nº de amostra	Microrganismos a 30 °C (ufc/g)	Leveduras a 25 °C (ufc/g)	Fungos filamentosos a 25 °C (ufc/g)	Microrganismos a 30 °C (ufc/g)	Leveduras a 25 °C (ufc/g)	Fungos filamentosos a 25 °C (ufc/g)
1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	1	22	0	0
3	1	1	1	7	1	0
4	1	1	1	5	0	0
5	17	1	1	1	0	0
Média	4,2	1	1	7	0,2	0
Desvio Padrão	7,16	0,00	0,00	8,86	0,45	0,00



**Figura 24** – Valores médios de contaminação microbiana na matéria-prima nos diferentes materiais

#### **4.5. Carga microbiana existente no produto não estéril (produto semi-acabado)**

Os dispositivos médicos podem ser embalados em molde rígido ou flexível, podendo ser mais ou menos manipulados. A **figura 25** mostra um *kit* (conjunto de produtos embalados) mais manipulado, enquanto que a **figura 26** mostra um *kit* menos manipulado.



**Figura 25** – *Kit* mais manipulado (imagens recolhidas na Medirm)



**Figura 26** – *Kit* rígido (imagens recolhidas na Medirm)

Os *kits* mais manipulados pertencem ao grupo dos *kits* dobrados em envelope; estes *kits* podem conter bolas de gaze, compressas de gaze, pinças em plástico, um tabuleiro onde é colocado todo o material e, por fim, um campo que envolve todos os produtos.

Os *kits* rígidos são menos manipulados uma vez que os produtos são colocados directamente na linha de produção. Um *kit* rígido pode conter os mesmos componentes que um *kit* flexível, a diferença é que este não possui um campo envolvente; neste tipo de *kits* o campo está dobrado, conforme mostra a **figura 27**.

Nestes dispositivos, foram analisados microrganismos a 30 °C, e fungos, conforme determina a legislação em vigor (EN ISO 11737-1).

Os dispositivos médicos mais manipulados apresentaram valores de contaminação mais elevados em ambos os parâmetros, microrganismos a 30 °C, fungos filamentosos e leveduras (**tabela 9**), contrariamente ao produto menos manipulado (**tabela 8**).

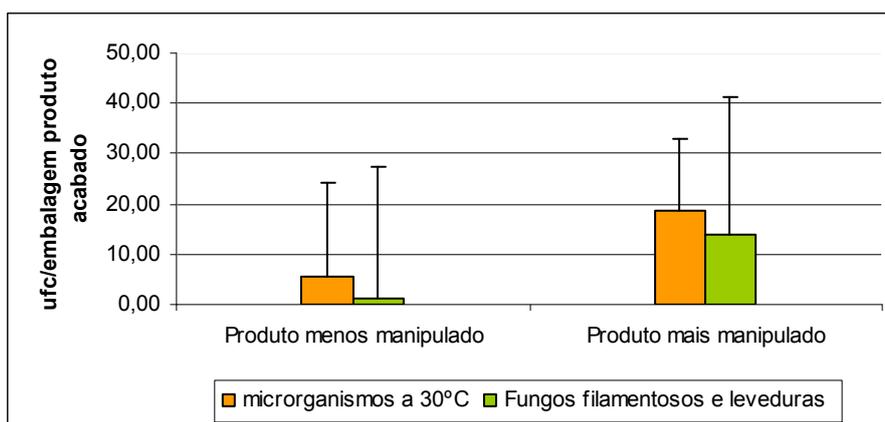
**Tabela 8** – Contaminação microbiana existente nos produtos menos manipulados

<b>Produto menos manipulado</b>		
<b>N.º de amostra</b>	<b>Microrganismos a 30 °C (ufc/embalagem)</b>	<b>Fungos filamentosos e leveduras (ufc/embalagem)</b>
1	4	0
2	8	1
3	0	0
4	1	0
5	4	3
6	7	4
7	2	1
8	3	0
9	3	0
10	2	0
11	2	1
12	3	2
13	34	5
14	17	1
15	1	1
16	3	0
17	1	1
18	3	1
Média	5,44	1,17
Desvio padrão	18,75	14

**Tabela 9** – Contaminação microbiana existente nos produtos mais manipulados

<b>Produto mais manipulado</b>		
<b>N.º de amostra</b>	<b>Microrganismos a 30 °C (ufc/embalagem)</b>	<b>Fungos filamentosos e leveduras (ufc/embalagem)</b>
1	5	3
2	7	0
3	5	18
4	13	7
5	29	0
6	80	80
7	11	1
8	0	3
Média	18,75	14,00
Desvio padrão	26,23	27,32

Para os produtos mais manipulados obteve-se uma média de 18,75 ufc/embalagem, enquanto que em produtos menos manipulados foi obtida uma média de 5,44 ufc/embalagem, no que se refere a microrganismos a 30 °C (**figura 27**).



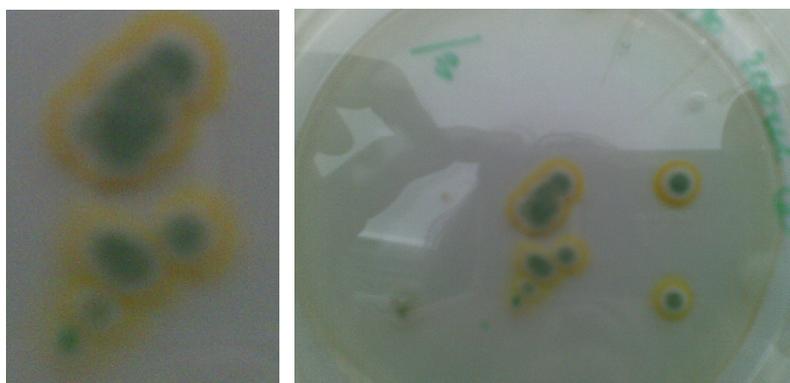
**Figura 27** – Valores médios de contaminação de produto semi-acabado

Também nestes valores, os desvios padrão são muito elevados, uma vez que se tratam de valores obtidos em diferentes produtos, uns mais manipulados que outros. O manipulador pode influenciar o nível de contaminação e altera os resultados, a contaminação das superfícies e a qualidade do ar no momento da embalagem não é linear, provocando também alterações nos níveis de contaminação.

#### **4.6. Proliferação de *Trichoderma reesei* ao longo do armazenamento**

Segundo a norma EN ISO 11737-1:2006, os dispositivos médicos devem ser controlados os parâmetros: microrganismos viáveis totais a 30 °C, fungos filamentosos e leveduras. Dos valores obtidos na matéria-prima e produto semi-acabado, estes valores foram muito baixos.

O *Trichoderma reesei* foi utilizado como exemplo de um fungo filamentoso (**figura 28**), para verificar o seu crescimento ao longo do tempo de armazenamento, em condições controladas, após contaminação de dispositivos médicos esterilizados. Para a contaminação dos dispositivos médicos, utilizou-se uma concentração de 1500 ufc/g de material.



**Figura 28** – Colônias de *Trichoderma reesei*

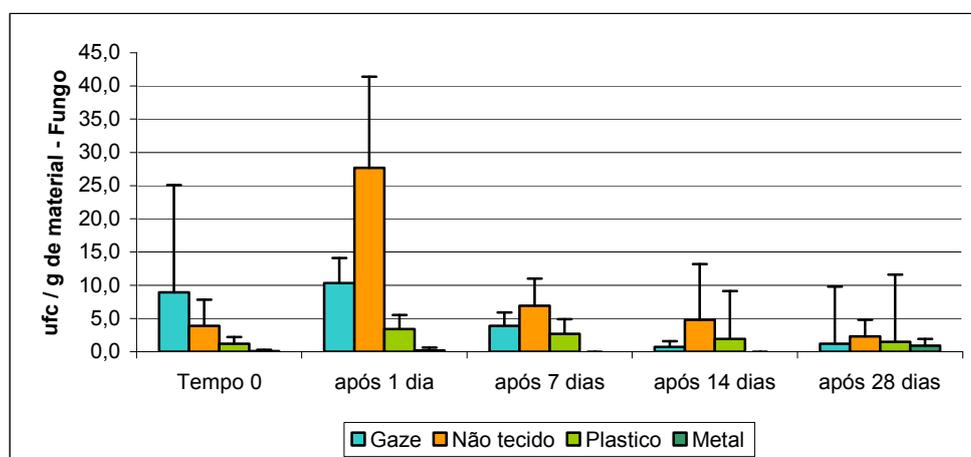
A **tabela 10** apresenta os valores médios de carga microbiana (ufc/g de material) obtidos ao longo do tempo de armazenamento.

**Tabela 10** – Valores médios de *Trichoderma reesei* em ufc/g de material

ufc/g de material*					
	Tempo zero	Após 1 dia	Após 7 dias	Após 14 dias	Após 28 dias
<b>Gaze</b>	8,9 ± 16,2	10,3 ± 3,9	3,9 ± 2,0	0,7 ± 0,9	1,2 ± 2,4
<b>Não tecido</b>	3,9 ± 3,8	27,7 ± 12,1	6,9 ± 4,1	4,8 ± 4,1	2,3 ± 1,5
<b>Plástico</b>	1,2 ± 1,0	3,4 ± 2,1	2,7 ± 2,2	1,9 ± 1,3	1,5 ± 1,2
<b>Metal</b>	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,9

\*n= 15 amostras

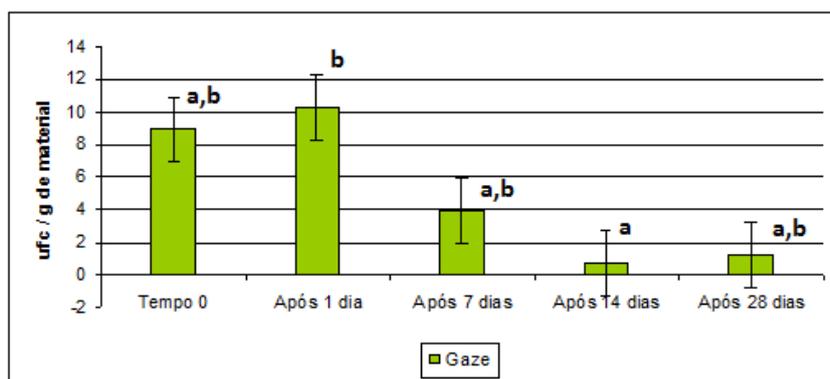
Estes resultados mostram que, de um modo geral, existe uma maior carga microbiana nos materiais gaze e não tecido, relativamente ao plástico e ao metal (**figura 29**).



**Figura 29** – Valores médios da proliferação de *Trichoderma reesei*, em ufc/g de material (15 réplicas)

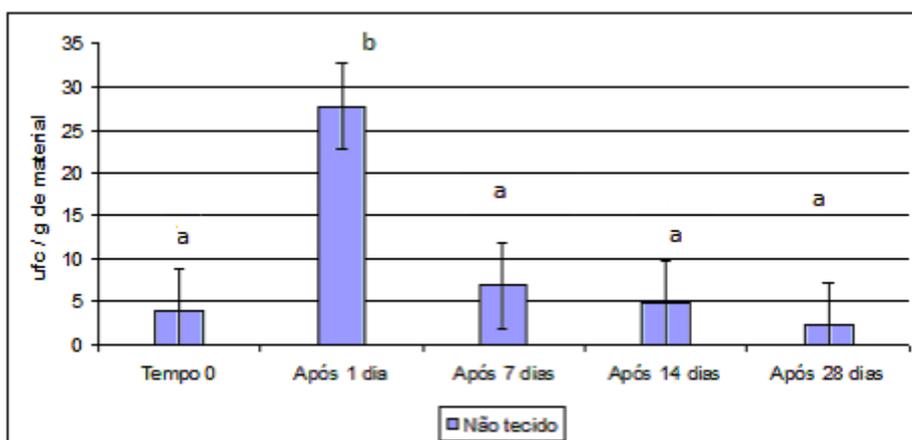
Observa-se também uma tendência de aumento da carga microbiana entre o tempo zero e 1 dia, seguido de uma diminuição progressiva (**tabela 10**). Estes resultados podem ser observados graficamente nas figuras seguintes

No caso dos dispositivos em gaze, o aumento entre o tempo zero e 1 dia não é significativo, mas a diminuição da carga microbiana nos períodos seguintes (**figura 30**) é estatisticamente significativo.



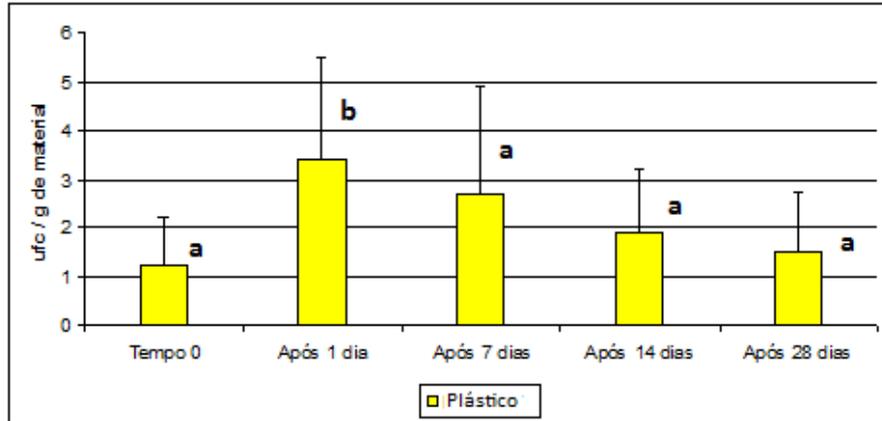
**Figura 30** – Valores médios de crescimento de *Trichoderma reesei* na gaze (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ ).

Nos dispositivos em não tecido, observa-se um aumento entre o tempo zero e 1 dia mas uma diminuição similar para o tempo de armazenamento seguinte (**figura 31**). De todos os dispositivos, o material em não tecido foi o que proporcionou um maior desenvolvimento do fungo.



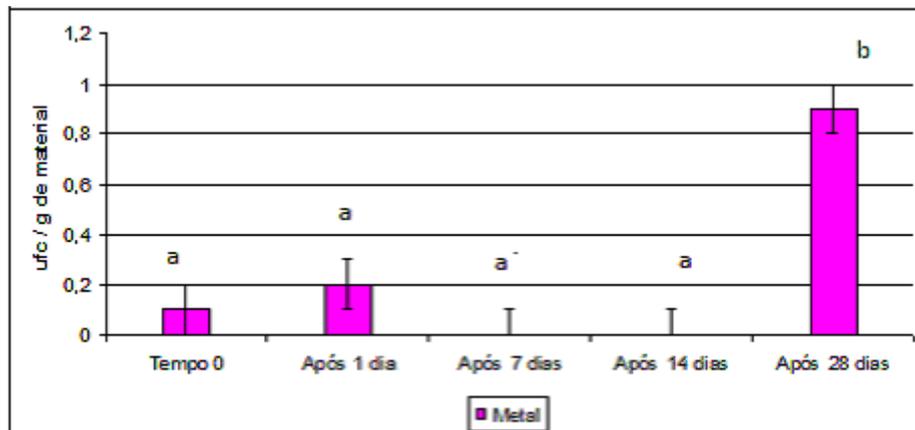
**Figura 31** – Valores médios de crescimento de *Trichoderma reesei* em não tecido (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ ).

Os dispositivos médicos em plástico apresentam valores de contaminação de *Trichoderma reesei* inferiores aos do não tecido mas um padrão similar de contaminação, com um aumento do tempo zero para um dia seguido da diminuição nos períodos seguintes (**figura 32**).



**Figura 32** – Valores médios de crescimento de *Trichoderma reesei* no plástico (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ ).

Nos dispositivos em metal, apresentaram sempre uma carga microbiana em *Trichoderma reesei* muito pequena ao longo de todo o período de armazenamento (figura 33).



**Figura 33** – Valores médios de crescimento de *Trichoderma reesei* no metal (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ ).

#### 4.7. Proliferação da *Escherichia coli* ao longo do armazenamento

As bactérias da espécie *Escherichia coli* são as predominantes na flora microbiana do cólon humano e pertencem à família das enterobactérias. A *Escherichia coli* pode aparecer nos dispositivos médicos devido a uma má higienização dos manipuladores,

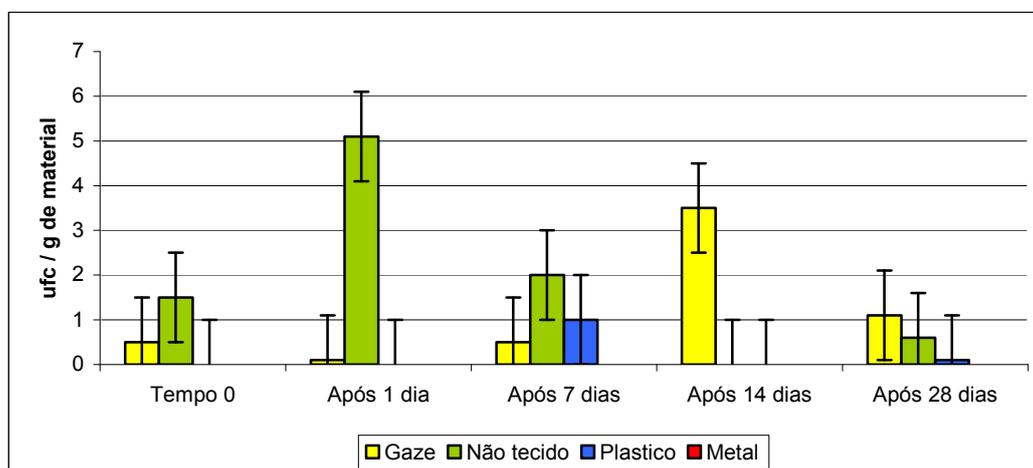
sendo este o motivo pelo qual escolhemos este microrganismo. O objectivo é verificar se, numa eventual contaminação por parte dos manipuladores, qual o desenvolvimento da carga microbiana da *Escherichia coli*. Para a contaminação dos dispositivos médicos, utilizou-se uma concentração de 1500 ufc/g de material. A **tabela 11** apresenta o número de ufc/g de material de *Escherichia coli* ao longo do tempo de armazenamento. Estes valores estão apresentados graficamente na **figura 34**.

De acordo com os valores obtidos, a proliferação da *Escherichia coli* foi mais elevada nos dispositivos de gaze e não tecido (**figura 34**); nos dispositivos plástico observou-se apenas 1 ufc/g de material ao fim de 7 e 28 dias, enquanto no metal não se observou qualquer carga microbiana.

**Tabela 11** – Valores médios de *Escherichia coli* em ufc/g de material

*ufc/g de material					
	Tempo zero	Após 1 dia	Após 7 dias	Após 14 dias	Após 28 dias
<b>Gaze</b>	0,5 ± 1,8	0,1 ± 0,5	0,5 ± 1,2	3,5 ± 3,1	1,1 ± 1,5
<b>Não tecido</b>	1,5 ± 3,8	5,1 ± 5,0	2,0 ± 3,9	0,0 ± 0,0	6,0 ± 1,7
<b>Plástico</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,4
<b>Metal</b>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

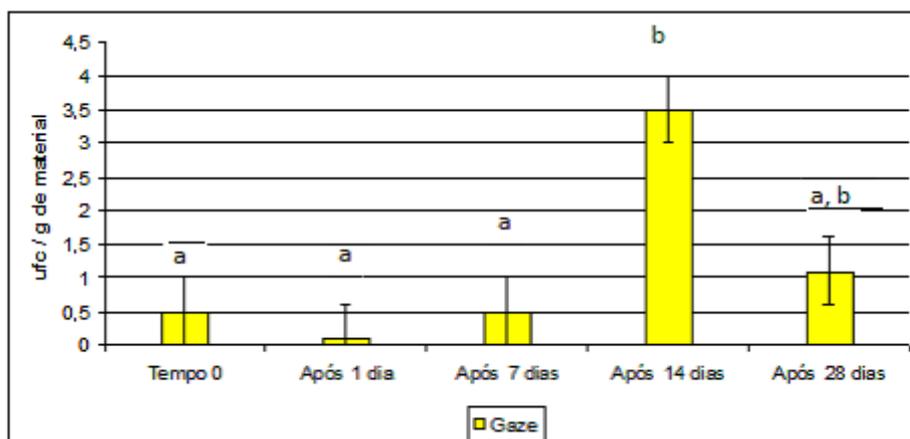
\* n= 15 amostras



**Figura 34** – Valores médios da proliferação de *Escherichia coli*, em ufc/g de material

No material de gaze, a fase de maior crescimento da carga microbiana verificou-se após 14 dias de armazenamento, enquanto que nos dispositivos em não tecido, a fase exponencial verificou-se após 1 dia de armazenamento. A adaptação da *Escherichia coli* foi mais rápida nos dispositivos em não tecido.

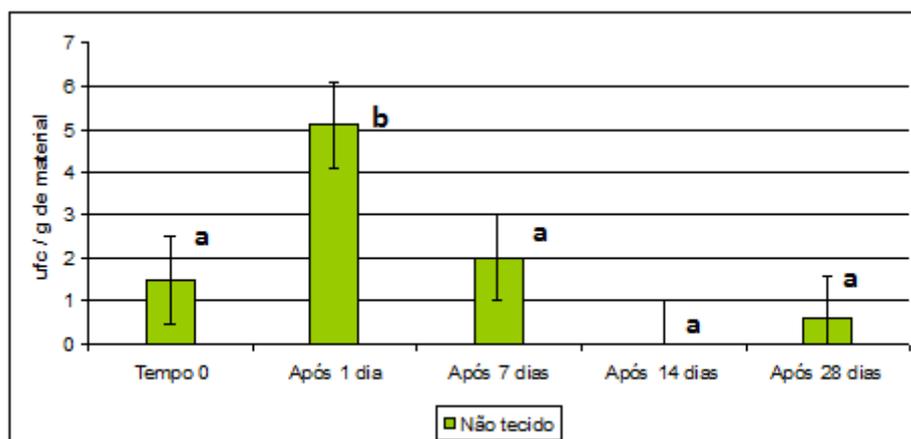
Nos dispositivos de gaze verificou-se um aumento da carga microbiana ao fim de 14 dias de armazenamento, seguido de decréscimo no período seguinte (**Figura 35**).



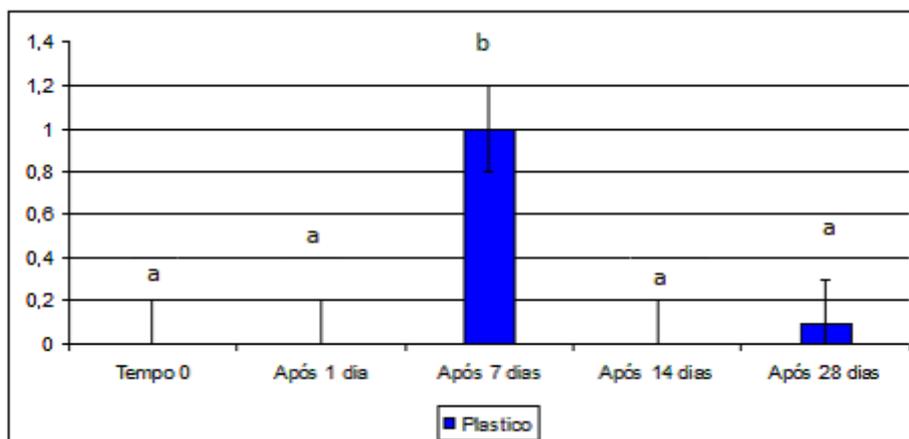
**Figura 35** - Valores médios de crescimento de *Escherichia coli* em gaze (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ ).

Nos dispositivos em não tecido observa-se um crescimento da carga microbiana após 1 dia de armazenamento, diminuindo nos períodos seguintes. Este padrão de crescimento é similar ao observado para o fungo *Trichoderma reesei* (**figura 36**).

Nos dispositivos em metal não se verificou crescimento ao longo dos 28 dias de armazenamento e nos dispositivos em plástico foi detectado crescimento após 7 dias de armazenamento (**figura 37**), seguida de diminuição da carga microbiana nos períodos seguintes.



**Figura 36** - Valores médios de crescimento de *Escherichia coli* em não tecido (letras diferentes correspondem a diferenças de médias entre as amostras para  $p < 0,05$ ).



**Figura 37** - Valores médios de crescimento de *Escherichia coli* em plástico (letras diferentes correspondem a diferenças de médias entre as amostras para  $p < 0,05$ ).

#### 4.8 - Evolução da carga microbiana ao longo do armazenamento

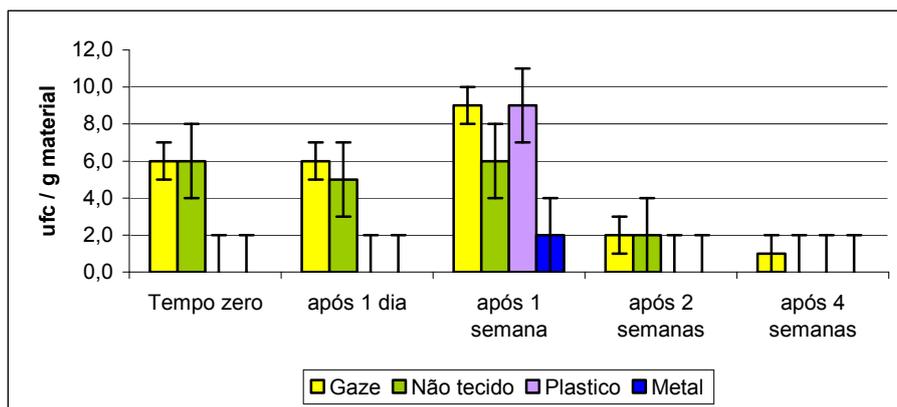
Os dispositivos médicos foram embalados na zona de produção da Medirm, sendo utilizado filme e papel adequados à esterilização dos dispositivos médicos. Após embalagem dos dispositivos médicos, estes ficaram em armazém, conforme a metodologia utilizada na proliferação do *Trichoderma reesei* e da *Escherichia coli*. Neste ensaio os dispositivos médicos não estão esterilizados. A **tabela 12** mostra os valores médios da contaminação microbiana existente nos dispositivos médicos.

**Tabela 12** – Valores médios de carga microbiana ao longo do armazenamento

ufc/g de material*					
	Tempo zero	Após 1 dia	Após 7 dias	Após 14 dias	Após 28 dias
<b>Gaze</b>	5,7 ± 4,4	5,5 ± 5,2	8,5 ± 3,6	2,4 ± 1,9	1,2 ± 1,0
<b>Não tecido</b>	6,1 ± 5,1	4,5 ± 5,4	6,1 ± 5,2	1,6 ± 1,7	0,3 ± 0,7
<b>Plástico</b>	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,6	9,3 ± 5,9	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0
<b>Metal</b>	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,5	1,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

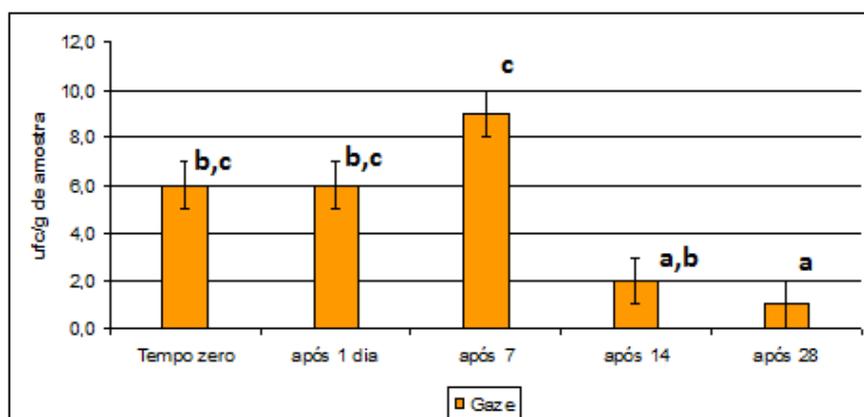
\* n= 15 amostras

Ao longo do tempo de armazenamento verificou-se um declínio no crescimento da carga microbiana, o que pode significar que em condições de armazenamento tende a reduzir (**figura 38**).



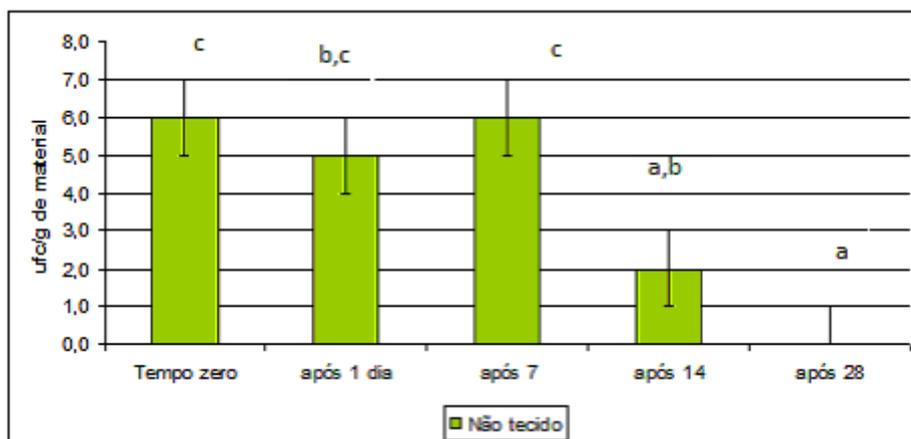
**Figura 38** – Valores médios de contaminação ao longo do armazenamento

Para o material de gaze, verificou-se um aumento do crescimento até ao sétimo dia de armazenamento, entrando em fase de declínio após 14 dias de armazenamento (**figura 39**).



**Figura 39** – Valores médios de crescimento microbiano ao longo do armazenamento em gaze (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ )

Para compressas em não tecido também se verificou um declínio no crescimento microbiano após 14 dias de armazenamento (**figura 40**).



**Figura 40** – Valores médios de crescimento microbiano ao longo do armazenamento em gaze (letras diferentes correspondem a diferenças de médias significativamente diferentes entre as amostras para  $p < 0,05$ )

Nos dispositivos em metal e em plástico, só foi detectado crescimento microbiano após 14 dias de armazenamento, como se verifica na **tabela 12**.

#### 4.9 – Carga microbiana após esterilização com óxido de etileno

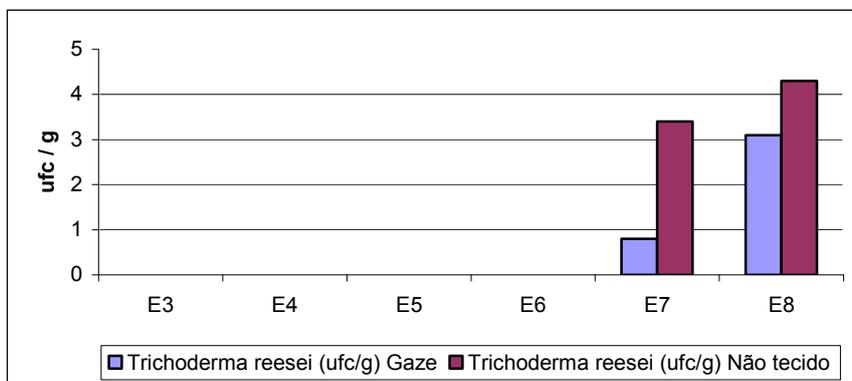
De acordo com a bibliografia, o óxido de etileno tem uma capacidade letal (SAL) até  $10^6$  ufc (Mendes *et al.*, 2007). O estudo da capacidade biocida do óxido de etileno realizou-se apenas nos dispositivos de gaze e não tecido, uma vez que foram estes que apresentaram melhores condições à proliferação do *Trichoderma reesei* e *Escherichia coli*. Os dispositivos médicos contaminados foram esterilizados com óxido de etileno, numa câmara de 250 litros.

A **tabela 13** mostra os valores obtidos após a esterilização.

**Tabela 13** – Valores médios de *Trichoderma reesei* após esterilização por óxido de etileno

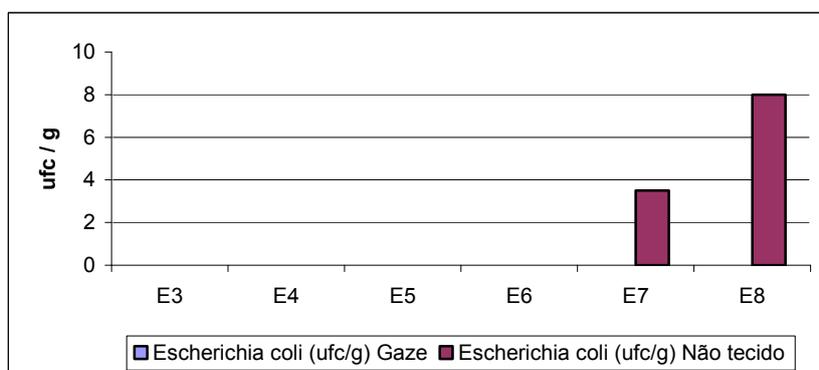
ufc/g	<i>Trichoderma reesei</i> (ufc/g)		<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)	
	Gaze	Não tecido	Gaze	Não tecido
$10^3$	0	0	0	0
$10^4$	0	0	0	0
$10^5$	0	0	0	0
$10^6$	0	0	0	0
$10^7$	0,8	3,4	0	3,5
$10^8$	3,1	4,3	0	7,9

Dos resultados obtidos verificou-se que o óxido de etileno é eficaz até um nível de contaminação de  $10^7$ , uma vez que foi detectado crescimento a partir deste nível de contaminação (**tabela 13**). Para o fungo, o material em não tecido foi o que apresentou valores mais elevados de contaminação (**figura 41**).



**Figura 41** – Valores médios de *Trichoderma reesei* após esterilização

O óxido de etileno teve um maior efeito biocida na *Escherichia coli*, pois observou-se uma menor carga microbiana, comparativamente com o fungo, e não se observou a presença de *Escherichia coli* na gaze, mesmo no material contaminado com carga microbiana de  $10^8$  (**figura 42**).



**Figura 42** – Valores médios de *Escherichia coli* após esterilização

#### 4.10 – Avaliação da contaminação microbiana utilizando o método enzimático da desidrogenase

Para o ensaio enzimático foi utilizado o *Trichoderma reesei*, a uma concentração de  $31 \times 10^7$  ufc/g de material. A actividade enzimática só foi detectada a partir de  $31 \times 10^7$  ufc/g (E7) (tabela 14).

Tabela 14 – Actividade enzimática da desidrogenase

	[ <i>Trichoderma reesei</i> ] ufc/g	Actividade enzimática
E2	$31 \times 10^2$	0,017
E3	$31 \times 10^3$	0,020
E4	$31 \times 10^4$	0,023
E5	$31 \times 10^5$	0,024
E6	$31 \times 10^6$	0,025
E7	$31 \times 10^7$	0,041
E8	$31 \times 10^8$	0,161

Este método apresenta sensibilidade para valores de carga microbiana superiores a  $10^7$ , com valores de absorvência superiores a 0,041 (Figura 43).

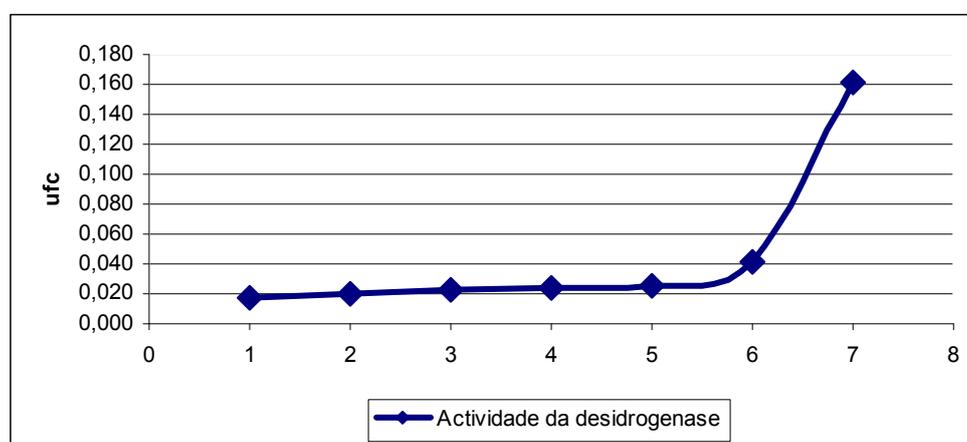


Figura 43 – Actividade enzimática da desidrogenase

Com este tipo de marcadores bioquímicos é possível quantificar um nível de contaminação mesmo em valores inferiores a  $10^6$ . Estes ensaios enzimáticos mostram ser um método alternativo aos métodos microbiológicos, pois obtêm-se resultados num menor período de tempo.

*Capítulo V*



*Conclusões*

Um processo de esterilização eficaz não depende apenas do tempo de exposição ao agente esterilizante, sendo necessária a sua validação, a qual envolve diversos parâmetros, nomeadamente o conhecimento da carga microbiana a que os dispositivos médicos estão sujeitos, incluindo a carga microbiana de manipuladores, superfícies, ar, e da carga microbiana da matéria-prima, produto acabado e semi-acabado.

Do estudo efectuado, conclui-se que a carga microbiana existente no ar apresenta-se mais elevada durante os períodos de produção, sendo heterogénea a sua distribuição nas várias salas que compõem a área de produção pois existe entrada e saída de pessoas e entrada de matéria-prima.

Também, nas diversas superfícies da área de produção a contaminação por fungos é heterogénea, observando-se uma maior contaminação em superfícies de maior utilização ou irregulares, como os puxadores das portas. As superfícies lisas apresentam uma carga microbiana baixa, indicativa de processos de limpeza de rotina eficazes.

Os resultados obtidos permitem identificar que a carga microbiana dos manipuladores aumenta nos períodos de mais quentes. Tal resultado permite estabelecer medidas mais rigorosas de higiene e uma maior frequência da limpeza e higienização dos manipuladores de modo a reduzir o risco de contaminação por parte destes. Ao nível dos manipuladores ainda é possível concluir que a touca e as mãos são os elementos com maior carga microbiana, mesmo no período de Inverno, pelo que se deve proceder à substituição das toucas e à lavagem e desinfeção as mãos com uma maior frequência.

Estes resultados mostram também que não há contaminação com *Escherichia coli* e/ou *Staphylococcus sp.*, pelo que os hábitos de higiene são adequados à manipulação dos dispositivos médicos.

Quanto à matéria-prima, entre os dispositivos médicos analisados, a gaze apresentou o maior valor de contaminação, mostrando mais susceptibilidade ao desenvolvimento de microrganismos, a qual aumenta nos primeiros períodos de armazenamento estudados (tempo zero, 1, 7, 14 e 28 dias).

Os dispositivos em não tecido mostraram possuir uma menor carga microbiana que a gaze mas ocorre o desenvolvimento de microrganismos ao longo do tempo de armazenamento, apresentando cargas contaminantes superiores à gaze para períodos de armazenamento mais longos.

Os materiais em plástico e metal apresentam geralmente uma menor carga microbiana com um desenvolvimento ao longo do tempo de armazenamento muito baixo ou nulo.

O metal foi o material que apresentou, de um modo geral, valores mais baixos de carga microbiana.

Os diversos factores relativos à produção e a matéria-prima avaliados estão dentro dos intervalos definidos na legislação actual.

A realização de um ensaio de esterilização por óxido de etileno de dispositivos médicos embalados permitiu verificar que, para os materiais e dispositivos específicos contaminados, o óxido de etileno tem uma capacidade letal de  $10^6$  ufc, confirmando os valores apresentados na bibliografia para outros dispositivos médicos.

A avaliação da possibilidade de utilização de um método enzimático para conhecer a carga microbiana, permitiu verificar que o método avaliado apresenta sensibilidade para valores de contaminação na ordem de  $10^6$  a  $10^7$  ufc, no limite superior ao da carga microbiana esterilizável pelo óxido de etileno em condições normais. A utilização deste método enzimático para determinar, mesmo que grosseiramente, a carga microbiana dos dispositivos médicos permitirá, no entanto, conhecer rapidamente quando a carga microbiana é tão elevada que obrigue a alteração das condições de esterilização (tempo, temperatura, pressão e humidade) e usá-lo em avaliações de rotina da carga microbiana dos dispositivos médicos a esterilizar, podendo tornar-se muito útil na libertação do produto para esterilização.

Os resultados e as conclusões obtidos permitem formar um embrião de conhecimento necessário para a implementação de uma unidade de esterilização de dispositivos médicos na empresa.

*Capítulo VI*

---

*Bibliografía*

Almeida, H. (2010). Vantagem da esterilização a vapor face a outras alternativas para o material de penso. VI Jornadas Nacionais de Esterilização, Paços de Ferreira, 28 e 29 de Maio.

Camiña, F., Cepeda, C.T.; Sotres, F.G. (1998). Measurement of dhydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biol. Biochem*, 30, 1005-1011.

Caravelli, A.; Giannuzzi, L.; Zaritzky, N. (2004). Effect of chlorine on filamentous microorganisms present in activated sludge as evaluated by respirometry and INT-dehydrogenase activity. *Water Research*, 38, 2395-2405.

Carballo, M.A., Flock, G.B., Martin, A.G., D'Aquino, M. (1987). Efecto tóxico del óxido de etileno en individuos expuestos. *Aqta Bioq. Latinoa*, 21 (22), 225-259.

Correia, C. (2007). Pesquisa de E. coli O157:H7 em hambúrgeres de bovino, utilizando um método imunoenzimático e de um método imunomagnético, *Revista Portuguesa de Clínica Terapêutica*, 1 (1), 159-162.

Cotton, R.T., Roark, R.C. (1928). Ethylene oxide as a fumigant. *Ind. Eng. Chem.*, 20, 805-809.

Coutinho, F.M.B., Mello, I.L. (2003). Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros: ciência e tecnologia*, 13 (1), 1-13.

Damarzo, D., Silva, A. (1997). Esterilização por óxido de etileno: a utilização de serviços terceirizados. *SOBECC*, 2 (1), 6-11.

Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho, as regras a que devem obedecer a investigação, o fabrico, a comercialização, a entrada em serviço, a vigilância e a publicidade dos dispositivos médicos e respectivos acessórios (transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2007/47/CE, do Parlamento e do Conselho Europeus, de 5 de Setembro).

Directiva 2007/47/CE, de 5 de Setembro de 2007, reflexos dos novos requisitos de avaliação nos documentos de conformidade.

Farmacopeia Portuguesa, 2005. Edição VIII, Infarmed, Lisboa.

Farmacopeia Portuguesa, 2008. Edição IX, Infarmed, Lisboa.

Ferraz, C.A.M. (1988). Teste de esterilidade em artigos médico-hospitalares: requisitos técnicos e interpretação de resultados. *Enfoque*, 16 (4), 90-94.

Glaser, Z.R. (1997). Special Occupational Hazard Review with control recommendations for the use of ethylene oxide as a sterilant in medical facilities. *Int. J. Health Serv.*, 13, 277-287.

Gong, P. (1996). Dihydrogenase activity in soil: A comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions; *Soil Biol. Biochem.*, 29 (2), 211-214.

Graziano, K.U., Castro, M.E.S., Moura, M.L.P.A. (2002). A importância do procedimento de limpeza nos processos de desinfecção e esterilização de artigos. *SOBECC*, 7 (3), 19-23.

Gunther, D.A. (1980). The chemistry and biology of ETO sterilization. *Med. Device Diagnostic Ind.*, 2 (12), p 31.

Harron, G.W., Harking-Jones, E.M.A., Martin, P.J. (2002). "Influence of thermoforming". The Queen's University of Belfast, Northern Ireland.

Herance, G. (1990). Esterilización con óxido de etileno: Repercusiones en el ambito hospitalario. *Rev. Enf.*, 13 (138), 19-22.

Hernandez, R.J., Selke, S.E.M., Culter, J.D. (2000). "*Plastic packaging: properties, processing, applications, and regulations.*" Hanser Gardner, Munich.

Longhi, L. F. (1994). Manual de esterilização por óxido de etileno. Atheneu, São Paulo.

Madeleine, J.M., Czene, K., Segerback, D., Vogel, E.W. (2003). Mutagenic activity of ethylene oxide and propylene oxide under XPG proficient and deficient conditions in relation to N-7-(2-Hydroxjakjl) guanine levels in drosophila; *Mutation Research*, 529, 95-107.

Mendes, G.C.C., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. (2007); Ethylene oxide sterilization of medical devices; *American Journal of Infection Control*, 35 (9), 574-581.

Mosher, J.J., Levison, B.S., Johnston, C.G. (2003). A simplified dehydrogenase enzyme assay in contaminated sediment using 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 411-415.

MULTIVAC (2004). trademark catalogue. Rollstock machine range. Multivac sepp haggemüller GmbH & Co. KG. Germany.

Münstedt, H. (2006). Advances in film blowing, thermoforming, and foaming by using long-chain branched polymers. International symposium on macromolecules proceedings, 41th World polymer congress. Março 2006, Rio de Janeiro.

Nogueira, M.H.N., Costa, M.G.P., Sanches, E.L., Avelar, M.C.Q. (1984). Estudos do nível de impregnação do ar ambiental pelo óxido de etileno. Parte I. *Enfoque*, 12 (2), 32-35.

Nogueira, M.H.N., Costa, M.G.P., Sanches, E.L., Avelar, M.C.Q. (1985). Estudos do nível de impregnação do ar ambiental pelo óxido de etileno. Parte II. *Enfoque*, 13 (1), 7-11.

Nogueira, M.H.N. (1989). Resíduos tóxicos em cânulas e seringas esterilizadas com óxido de etileno. *Rev. Ins. Adolfo Lutz*, 49 (1), 27-34.

O' Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. (2001). The Merck Index, 13th ed. Merck & Co.; Whitehouse Station, Nova Iorque, p. 676.

Padoveze, M.C. (2003). "Esterilização: aspectos gerais". In APECIH - Esterilização de artigos em unidades de saúde. São Paulo, p. 2-18.

Pettersen, M.K., Gällstedt, M., Eir, T. (2004). "Oxygen barrier properties of thermoformed trays manufactured with different drawing methods and drawing depths". *Packaging Technology and Science*. John Wiley & Sons Ltd, 17 (1), 43-52.

Pekalski, A.A., Zevenbergen, J.F., Braithwaite, M., Lemkowitz, S.M., Palman, H.J. (2005). Explosive decomposition of ethylene oxide at elevated condition: Effect of

ignition energy, nitrogen dilution, and turbulence; *Journal of Hazardous Materials*; A118, 19-34.

Pithon, M.M., Santos, R.L., Martins, F.O., Romanos, M.T.V., Araújo, M.T.D., (2010). Cytotoxicity of orthodontic separating elastics. *Australian Orthodontic Journal*, 26 (1), 16-20.

Possari, J.F. (2003). "Esterilização por óxido de etileno". Iátria, São Paulo.

Roman, A. (1997). "Polietileno PEBD: Processo de transformação". Érica, São Paulo.

Rusyn, R., Asakura, S., Li, Y., Kosyk, O., Koc, H., Nakamura, J., Upton, P.B., Swenberg, J.A. (2005). Effects of ethylene oxide and ethylene inhalation on DNA adducts, apurinic/apyrimidinic sites and expression of base excision DNA repair genes in rat brain, spleen, and liver; *DNA Repair*, 4, 1099-1110.

Rutala, W.A., Weber, D.J. (1999). Infection control: the role of disinfection and sterilization; *Journal of Hospital Infection*, 43, S43-S55.

Sarantópoulos, C.I.G.L., Oliveira, L.M., Padula, M., Coltro, L., Alves, R.M.V., Garcia, E.E.C. (2002). "Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades". CETE A/ ITAL, Campinas.

Smith, W.F. (1998). "Princípios de ciência e engenharia dos materiais". 3ª Edição, McGraw-Hill, Portugal.

Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 387-401.

Tsai, S., Wu, K. (2003). Determination of ethylene oxide by solid-phase microextraction device with on-fiber derivatization; *Journal of Chromatography*, 991, 1-11.

[www.infarmed.pt](http://www.infarmed.pt), Setembro 2010.

[www.sterigenics.com](http://www.sterigenics.com), Setembro 2010.

Xu, H.; Kazmer, D.O. (2001). "Thermoforming shrinkage prediction". *Polymer engineering and science*, 41 (9),1553-1563.

Zanon, U. (1987). Esterilização. *In* Zanon, U., Neves, J. (editores), "Infecções Hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento". Medsi, Rio de Janeiro, p.831-858.

*Anexos*

---

**ANEXO 1** – Tratamento estatístico dos resultados da contaminação pelo *Trichoderma reesei*

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Gaze	Between Groups	1038,154	4	259,538	4,765	,002
	Within Groups	3485,759	64	54,465		
	Total	4523,913	68			
não tecido	Between Groups	5392,744	4	1348,186	36,290	,000
	Within Groups	2229,040	60	37,151		
	Total	7621,785	64			
Plastico	Between Groups	44,975	4	11,244	3,972	,006
	Within Groups	175,503	62	2,831		
	Total	220,478	66			
Metal	Between Groups	7,493	4	1,873	9,906	,000
	Within Groups	13,048	69	,189		
	Total	20,541	73			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Gaze	.00	1,00	-1,27692	2,79654	,991	-9,1270	6,5731	
		7,00	4,72308	2,79654	,448	-3,1270	12,5731	
		14,00	8,12308*	2,79654	,039	,2730	15,9731	
		28,00	7,74126	3,02340	,090	-,7456	16,2282	
	1,00	.00	1,27692	2,79654	,991	-6,5731	9,1270	
		7,00	6,00000	2,69481	,183	-1,5645	13,5645	
		14,00	9,40000*	2,69481	,008	1,8355	16,9645	
		28,00	9,01818*	2,92957	,025	,7947	17,2417	
	7,00	.00	-4,72308	2,79654	,448	-12,5731	3,1270	
		1,00	-6,00000	2,69481	,183	-13,5645	1,5645	
		14,00	3,40000	2,69481	,715	-4,1645	10,9645	
		28,00	3,01818	2,92957	,840	-5,2053	11,2417	
	14,00	.00	-8,12308*	2,79654	,039	-15,9731	-,2730	
		1,00	-9,40000*	2,69481	,008	-16,9645	-1,8355	
		7,00	-3,40000	2,69481	,715	-10,9645	4,1645	
		28,00	-,38182	2,92957	1,000	-8,6053	7,8417	
	28,00	.00	-7,74126	3,02340	,090	-16,2282	,7456	
		1,00	-9,01818*	2,92957	,025	-17,2417	-,7947	
		7,00	-3,01818	2,92957	,840	-11,2417	5,2053	
		14,00	,38182	2,92957	1,000	-7,8417	8,6053	
	nãotecido	.00	1,00	-23,75000*	2,48833	,000	-30,7483	-16,7517
			7,00	-3,01667	2,36064	,706	-9,6559	3,6225
			14,00	-,91667	2,48833	,996	-7,9150	6,0817
			28,00	1,63095	2,39781	,960	-5,1128	8,3747
1,00		.00	23,75000*	2,48833	,000	16,7517	30,7483	
		7,00	20,73333*	2,36064	,000	14,0941	27,3725	
		14,00	22,83333*	2,48833	,000	15,8350	29,8317	
		28,00	25,38095*	2,39781	,000	18,6372	32,1247	
7,00		.00	3,01667	2,36064	,706	-3,6225	9,6559	
		1,00	-20,73333*	2,36064	,000	-27,3725	-14,0941	
		14,00	2,10000	2,36064	,900	-4,5392	8,7392	
		28,00	4,64762	2,26502	,255	-1,7227	11,0179	
14,00		.00	,91667	2,48833	,996	-6,0817	7,9150	
		1,00	-22,83333*	2,48833	,000	-29,8317	-15,8350	
		7,00	-2,10000	2,36064	,900	-8,7392	4,5392	
		28,00	2,54762	2,39781	,825	-4,1961	9,2914	
28,00		.00	-1,63095	2,39781	,960	-8,3747	5,1128	
		1,00	-25,38095*	2,39781	,000	-32,1247	-18,6372	
		7,00	-4,64762	2,26502	,255	-11,0179	1,7227	
		14,00	-2,54762	2,39781	,825	-9,2914	4,1961	
Plastico		.00	1,00	-2,13333*	,61435	,008	-3,8595	-,4072
			7,00	-1,40000	,61435	,166	-3,1261	,3261
			14,00	-,64242	,66787	,871	-2,5189	1,2341
			28,00	-,18788	,66787	,999	-2,0644	1,6886
	1,00	.00	2,13333*	,61435	,008	,4072	3,8595	
		7,00	,73333	,61435	,755	-,9928	2,4595	
		14,00	1,49091	,66787	,182	-,3856	3,3674	
		28,00	1,94545*	,66787	,038	,0690	3,8219	
	7,00	.00	1,40000	,61435	,166	-,3261	3,1261	
		1,00	-,73333	,61435	,755	-2,4595	,9928	
		14,00	,75758	,66787	,788	-1,1189	2,6341	
		28,00	1,21212	,66787	,374	-,6644	3,0886	
	14,00	.00	,64242	,66787	,871	-1,2341	2,5189	
		1,00	-1,49091	,66787	,182	-3,3674	,3856	
		7,00	-,75758	,66787	,788	-2,6341	1,1189	
		28,00	,45455	,71741	,969	-1,5611	2,4702	
	28,00	.00	,18788	,66787	,999	-1,6886	2,0644	
		1,00	-1,94545*	,66787	,038	-3,8219	-,0690	
		7,00	-1,21212	,66787	,374	-3,0886	,6644	
		14,00	-,45455	,71741	,969	-2,4702	1,5611	
	Metal	.00	1,00	-,13333	,15879	,917	-,5781	,3115
			7,00	,06667	,15879	,993	-,3781	,5115
			14,00	,06667	,15879	,993	-,3781	,5115
			28,00	-,79048*	,16160	,000	-1,2431	-,3378
1,00		.00	,13333	,15879	,917	-,3115	,5781	
		7,00	,20000	,15879	,717	-,2448	,6448	
		14,00	,20000	,15879	,717	-,2448	,6448	
		28,00	-,65714*	,16160	,001	-1,1098	-,2045	
7,00		.00	-,06667	,15879	,993	-,5115	,3781	
		1,00	-,20000	,15879	,717	-,6448	,2448	
		14,00	,00000	,15879	1,000	-,4448	,4448	
		28,00	-,85714*	,16160	,000	-1,3098	-,4045	
14,00		.00	-,06667	,15879	,993	-,5115	,3781	
		1,00	-,20000	,15879	,717	-,6448	,2448	
		7,00	,00000	,15879	1,000	-,4448	,4448	
		28,00	-,85714*	,16160	,000	-1,3098	-,4045	
28,00		.00	,79048*	,16160	,000	,3378	1,2431	
		1,00	,65714*	,16160	,001	,2045	1,1098	
		7,00	,85714*	,16160	,000	,4045	1,3098	
		14,00	,85714*	,16160	,000	,4045	1,3098	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

**ANEXO 2** – Tratamento estatístico dos resultados da contaminação pelo *Escherichia coli*

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GazeB	Between Groups	111,920	4	27,980	6,748	,000
	Within Groups	290,267	70	4,147		
	Total	402,187	74			
NtecidoB	Between Groups	187,266	4	46,817	4,294	,004
	Within Groups	697,719	64	10,902		
	Total	884,986	68			
MetalB	Between Groups	,000	4	,000		
	Within Groups	,000	70	,000		
	Total	,000	74			
PlasticoB	Between Groups	11,413	4	2,853	14,544	,000
	Within Groups	13,733	70	,196		
	Total	25,147	74			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
GazeB	,00	1,00	,33333	,74356	,991	-1,7488	2,4154
		7,00	-,06667	,74356	1,000	-2,1488	2,0154
		14,00	-3,00000*	,74356	,001	-5,0821	-,9179
		28,00	-1,20000	,74356	,494	-3,2821	,8821
	1,00	,00	-,33333	,74356	,991	-2,4154	1,7488
		7,00	-,40000	,74356	,983	-2,4821	1,6821
		14,00	-3,33333*	,74356	,000	-5,4154	-1,2512
		28,00	-1,53333	,74356	,248	-3,6154	,5488
	7,00	,00	,06667	,74356	1,000	-2,0154	2,1488
		1,00	,40000	,74356	,983	-1,6821	2,4821
		14,00	-2,93333*	,74356	,002	-5,0154	-,8512
		28,00	-1,13333	,74356	,551	-3,2154	,9488
	14,00	,00	3,00000*	,74356	,001	,9179	5,0821
		1,00	3,33333*	,74356	,000	1,2512	5,4154
		7,00	2,93333*	,74356	,002	,8512	5,0154
		28,00	1,80000	,74356	,122	-,2821	3,8821
	28,00	,00	1,20000	,74356	,494	-,8821	3,2821
		1,00	1,53333	,74356	,248	-,5488	3,6154
		7,00	1,13333	,74356	,551	-,9488	3,2154
		14,00	-1,80000	,74356	,122	-3,8821	,2821
NtecidoB	,00	1,00	-3,62424	1,31068	,055	-7,3034	,0549
		7,00	-,53333	1,20565	,992	-3,9177	2,8510
		14,00	1,46667	1,20565	,742	-1,9177	4,8510
		28,00	,85128	1,25116	,960	-2,6608	4,3634
	1,00	,00	3,62424	1,31068	,055	-,0549	7,3034
		7,00	3,09091	1,31068	,140	-,5882	6,7701
		14,00	5,09091*	1,31068	,002	1,4118	8,7701
		28,00	4,47552*	1,35266	,013	,6785	8,2725
	7,00	,00	,53333	1,20565	,992	-2,8510	3,9177
		1,00	-3,09091	1,31068	,140	-6,7701	,5882
		14,00	2,00000	1,20565	,466	-1,3843	5,3843
		28,00	1,38462	1,25116	,802	-2,1275	4,8967
	14,00	,00	-1,46667	1,20565	,742	-4,8510	1,9177
		1,00	-5,09091*	1,31068	,002	-8,7701	-1,4118
		7,00	-2,00000	1,20565	,466	-5,3843	1,3843
		28,00	-,61538	1,25116	,988	-4,1275	2,8967
	28,00	,00	-,85128	1,25116	,960	-4,3634	2,6608
		1,00	-4,47552*	1,35266	,013	-8,2725	-,6785
		7,00	-1,38462	1,25116	,802	-4,8967	2,1275
		14,00	,61538	1,25116	,988	-2,8967	4,1275
PlasicoB	,00	1,00	,00000	,16174	1,000	-,4529	,4529
		7,00	-1,00000*	,16174	,000	-1,4529	-,5471
		14,00	,00000	,16174	1,000	-,4529	,4529
		28,00	-,13333	,16174	,922	-,5862	,3196
	1,00	,00	,00000	,16174	1,000	-,4529	,4529
		7,00	-1,00000*	,16174	,000	-1,4529	-,5471
		14,00	,00000	,16174	1,000	-,4529	,4529
		28,00	-,13333	,16174	,922	-,5862	,3196
	7,00	,00	1,00000*	,16174	,000	,5471	1,4529
		1,00	1,00000*	,16174	,000	,5471	1,4529
		14,00	1,00000*	,16174	,000	,5471	1,4529
		28,00	,86667*	,16174	,000	,4138	1,3196
	14,00	,00	,00000	,16174	1,000	-,4529	,4529
		1,00	,00000	,16174	1,000	-,4529	,4529
		7,00	-1,00000*	,16174	,000	-1,4529	-,5471
		28,00	-,13333	,16174	,922	-,5862	,3196
	28,00	,00	,13333	,16174	,922	-,3196	,5862
		1,00	,13333	,16174	,922	-,3196	,5862
		7,00	-,86667*	,16174	,000	-1,3196	-,4138
		14,00	-,13333	,16174	,922	-,3196	,5862

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

**ANEXO 3 – Tratamento estatístico dos resultados da contaminação ao longo do tempo de armazenamento**

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GazeA	Between Groups	500,587	4	125,147	9,817	,000
	Within Groups	892,400	70	12,749		
	Total	1392,987	74			
NtecidoA	Between Groups	430,933	4	107,733	6,349	,000
	Within Groups	1187,733	70	16,968		
	Total	1618,667	74			
PlasticoA	Between Groups	991,467	4	247,867	35,323	,000
	Within Groups	491,200	70	7,017		
	Total	1482,667	74			
MetalA	Between Groups	26,453	4	6,613	49,600	,000
	Within Groups	9,333	70	,133		
	Total	35,787	74			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
GazeA	.00	1,00	,26667	1,30377	1,000	-3,3841	3,9174	
		7,00	-2,73333	1,30377	,233	-6,3841	,9174	
		14,00	3,33333	1,30377	,090	-,3174	6,9841	
		28,00	4,53333*	1,30377	,008	,8826	8,1841	
	1,00	.00	-,26667	1,30377	1,000	-3,9174	3,3841	
		7,00	-3,00000	1,30377	,157	-6,6507	,6507	
		14,00	3,06667	1,30377	,141	-,5841	6,7174	
		28,00	4,26667*	1,30377	,014	,6159	7,9174	
	7,00	.00	2,73333	1,30377	,233	-,9174	6,3841	
		1,00	3,00000	1,30377	,157	-,6507	6,6507	
		14,00	6,06667*	1,30377	,000	2,4159	9,7174	
		28,00	7,26667*	1,30377	,000	3,6159	10,9174	
	14,00	.00	-3,33333	1,30377	,090	-6,9841	,3174	
		1,00	-3,06667	1,30377	,141	-6,7174	,5841	
		7,00	-6,06667*	1,30377	,000	-9,7174	-2,4159	
		28,00	1,20000	1,30377	,888	-2,4507	4,8507	
	28,00	.00	-4,53333*	1,30377	,008	-8,1841	-,8826	
		1,00	-4,26667*	1,30377	,014	-7,9174	-,6159	
		7,00	-7,26667*	1,30377	,000	-10,9174	-3,6159	
		14,00	-1,20000	1,30377	,888	-4,8507	2,4507	
	NtecidoA	.00	1,00	1,60000	1,50411	,824	-2,6117	5,8117
			7,00	,00000	1,50411	1,000	-4,2117	4,2117
			14,00	4,53333*	1,50411	,029	,3216	8,7451
			28,00	5,86667*	1,50411	,002	1,6549	10,0784
1,00		.00	-1,60000	1,50411	,824	-5,8117	2,6117	
		7,00	-1,60000	1,50411	,824	-5,8117	2,6117	
		14,00	2,93333	1,50411	,301	-1,2784	7,1451	
		28,00	4,26667*	1,50411	,046	,0549	8,4784	
7,00		.00	,00000	1,50411	1,000	-4,2117	4,2117	
		1,00	1,60000	1,50411	,824	-2,6117	5,8117	
		14,00	4,53333*	1,50411	,029	,3216	8,7451	
		28,00	5,86667*	1,50411	,002	1,6549	10,0784	
14,00		.00	-4,53333*	1,50411	,029	-8,7451	-,3216	
		1,00	-2,93333	1,50411	,301	-7,1451	1,2784	
		7,00	-4,53333*	1,50411	,029	-8,7451	-,3216	
		28,00	1,33333	1,50411	,901	-2,8784	5,5451	
28,00		.00	-5,86667*	1,50411	,002	-10,0784	-1,6549	
		1,00	-4,26667*	1,50411	,046	-8,4784	-,0549	
		7,00	-5,86667*	1,50411	,002	-10,0784	-1,6549	
		14,00	-1,33333	1,50411	,901	-5,5451	2,8784	
PlasticoA		.00	1,00	-,06667	,96727	1,000	-2,7752	2,6418
			7,00	-9,00000*	,96727	,000	-11,7085	-6,2915
			14,00	,06667	,96727	1,000	-2,6418	2,7752
			28,00	,33333	,96727	,997	-2,3752	3,0418
	1,00	.00	,06667	,96727	1,000	-2,6418	2,7752	
		7,00	-8,93333*	,96727	,000	-11,6418	-6,2248	
		14,00	,13333	,96727	1,000	-2,5752	2,8418	
		28,00	,40000	,96727	,994	-2,3085	3,1085	
	7,00	.00	9,00000*	,96727	,000	6,2915	11,7085	
		1,00	8,93333*	,96727	,000	6,2248	11,6418	
		14,00	9,06667*	,96727	,000	6,3582	11,7752	
		28,00	9,33333*	,96727	,000	6,6248	12,0418	
	14,00	.00	-,06667	,96727	1,000	-2,7752	2,6418	
		1,00	-,13333	,96727	1,000	-2,8418	2,5752	
		7,00	-9,06667*	,96727	,000	-11,7752	-6,3582	
		28,00	,26667	,96727	,999	-2,4418	2,9752	
	28,00	.00	-,33333	,96727	,997	-3,0418	2,3752	
		1,00	-,40000	,96727	,994	-3,1085	2,3085	
		7,00	-9,33333*	,96727	,000	-12,0418	-6,6248	
		14,00	-,26667	,96727	,999	-2,9752	2,4418	
	MetalA	.00	1,00	-,40000*	,13333	,030	-,7734	-,0266
			7,00	-1,53333*	,13333	,000	-1,9067	-1,1600
			14,00	,00000	,13333	1,000	-,3734	,3734
			28,00	,00000	,13333	1,000	-,3734	,3734
1,00		.00	-,40000*	,13333	,030	,0266	-,7734	
		7,00	-1,13333*	,13333	,000	-1,5067	-,7600	
		14,00	,40000*	,13333	,030	,0266	,7734	
		28,00	-,40000*	,13333	,030	,0266	-,7734	
7,00		.00	1,53333*	,13333	,000	1,1600	1,9067	
		1,00	1,13333*	,13333	,000	,7600	1,5067	
		14,00	1,53333*	,13333	,000	1,1600	1,9067	
		28,00	1,53333*	,13333	,000	1,1600	1,9067	
14,00		.00	,00000	,13333	1,000	-,3734	,3734	
		1,00	-,40000*	,13333	,030	-,7734	-,0266	
		7,00	-1,53333*	,13333	,000	-1,9067	-1,1600	
		28,00	,00000	,13333	1,000	-,3734	,3734	
28,00		.00	,00000	,13333	1,000	-,3734	,3734	
		1,00	-,40000*	,13333	,030	-,7734	-,0266	
		7,00	-1,53333*	,13333	,000	-1,9067	-1,1600	
		14,00	-,00000	,13333	1,000	-,3734	,3734	

\*. The mean difference is significant at the .05 level.