

Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Validação do processo de esterilização por óxido de etileno para determinar o
tempo de aeração em frascos enterais

Hugo Campos Oliveira Santos
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

GOIÂNIA - GO
2010

HUGO CAMPOS OLIVEIRA SANTOS

Validação do processo de esterilização por óxido de etileno para determinar o tempo de aeração em frascos enterais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração:

Fármacos e Medicamentos

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

GOIÂNIA-GO

2010

OFEREÇO

Ofereço a Deus minha eterna gratidão pelo dom da vida, saúde e pela oportunidade de compartilhar com pessoas tão especiais, essa importante etapa da minha vida.

DEDICO

A minha esposa Kelly Tacon, que com muito amor e carinho me incentivou e me auxiliou durante a execução deste trabalho e sem a qual eu não teria conseguido chegar até o fim.

Aos meus pais, Magda e Ildeu, pelo amor incondicional, por suas orações que me fortaleceram e seus ensinamentos os quais guardarei para o resto da vida.

Aos meus irmãos, Marthius e Mynéia, pelo carinho, torcida e pensamentos positivos.

Em especial dedico este trabalho a Leandro Rosa, químico que me auxiliou na utilização de equipamentos do controle de qualidade e ao senhor Marcelo Perillo sócio-proprietário da FBMFARMA.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa os seus agradecimentos:

Aos integrantes da banca examinadora e a Universidade Federal de Goiás, pelos conhecimentos adquiridos e notável sabedoria;

Ao Professor Dr. Luiz Carlos da Cunha pela orientação, amizade, apoio e tolerância;

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Farmácia, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste estudo.

*“Deus mandará que os seus anjos cuidem de você para
protegê-lo em todos os momentos de sua vida”*

Salmo 91

RESUMO

Para estabelecer a segurança da esterilidade nos frascos enterais faz-se necessário a validação do processo de esterilização. O objetivo deste estudo foi determinar o tempo de aeração residual em frascos enterais esterilizados por óxido de etileno. Foram utilizados 120 frascos enterais para realizar a qualificação física, microbiológica e química residual em três ciclos consecutivos 534, 535 e 536. Sensores e integradores químicos foram instalados na autoclave para monitorar os parâmetros de umidade relativa ($UR \geq 35\%$), temperatura ($55^{\circ}\text{C} \pm 10$), pressão ($0,750\text{kgf/cm}^2 \pm 50$) e tempo de esterilização (6h). Testes de esterilidade e ensaios de endotoxina avaliaram o resultado do bioindicador rápido, leitura em 4h. Realizou-se a validação do método analítico por cromatografia a gás (GCFID) como técnica para determinar a concentração de óxido de etileno residual. O uso do Bioindicador (*Bacillus atrophaeus*) foi aprovado pelos testes de esterilidade (14 dias), ensaio de endotoxina ($< 0,5\text{EU/ml}$) e eliminação microbiana de 12 ciclos logarítmicos ($\text{SAL}10^{-6}$). A técnica de análise (GCFID) apresentou linearidade no intervalo de 1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de EtO, exatidão média 100,4%, precisão e robustez: DPR $< 5\%$ (RE 899/2003, ANVISA). A dissipação residual foi significativa $p < 0,05$ para todos os tempos de aeração avaliados. A partir de 6h de aeração obteve-se $7,77 \pm 0,97 \mu\text{g/ml}$ de EtO residual nos frascos enterais. Esta concentração foi aprovada no limite de 10 $\mu\text{g/ml}$, aceitável para produtos farmacêuticos. A validação permitiu aprovar os parâmetros de esterilização, introduzir a esterilidade nos frascos enterais e determinar o tempo mínimo de 6 h de aeração.

PALAVRAS - CHAVE: Validação. Esterilização. Óxido de Etileno. Enteral

ABSTRACT

To enter the safety and sterility in enteral feeding bottles is necessary to validate the sterilization process. The aim of this study was to determine the aeration time residual enteral bottles sterilized by ethylene oxide. Enteral bottles 120 to achieve the qualification physical, microbiological and chemical in three consecutive cycles 534, 535 and 536. Physicals sensors and chemical integrators in the autoclave were installed to monitor the parameters of relative humidity ($RH \geq 35\%$), temperature ($55^{\circ}\text{C} \pm 10$), pressure ($0.750 \text{ kgf/cm}^2 \pm 50$) and sterilization time (6h). Tests for sterility and endotoxin tests evaluated the result of rapid bioindicator for reading on 4h. We performed the validation of analytical method by gas chromatography (*GCFID*), as a technique to determine the concentration of ethylene oxide residue. The use of rapid bioindicator (*Bacillus atropheus*) was approved for sterility testing (14 days), test for endotoxin $<0.5 \text{ EU/ml}$ and elimination of microbial 12 logarithmic cycles ($\text{SAL}10^{-6}$). The analysis technique (*GCFID*) was linearity in the range 1-50 $\mu\text{g/ml}$ of EtO, 100.4% average accuracy, precision and robustness: $\text{RSD} < 5\%$ (RE 899/2003, ANVISA). The residual dissipation was significant $p < 0.05$ for all time aeration evaluated. After time 6h aeration was obtained $7.77 \pm 0.97 \mu\text{g/ml}$ of the EtO residual enteral bottles. This concentration was approved a limited of 10 $\mu\text{g/ml}$, acceptable for pharmaceutical products. The validation allowed approving the parameters of sterilization; the enteral bottles enter the sterile and determine the minimum time of 6h of aeration process.

KEY WORD: Validation. Sterilization. Ethylene Oxide. Enteral

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 MATERIAIS	21
4.1.1 AMOSTRA	21
4.1.2 EQUIPAMENTO	21
4.1.3 OUTROS MATERIAIS	21
4.2 MÉTODOS	22
4.2.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4.2.2 AMOSTRAGEM	22
4.2.3 PRÉ-QUALIFICAÇÃO	24
4.2.3 QUALIFICAÇÃO FÍSICA	24
4.2.3.1 USO DOS SENSORES FÍSICOS COMPETEC®.	24
4.2.3.2 USO DOS INTEGRADORES QUÍMICOS - CLASSE IV	25
4.2.3 QUALIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA	25
4.2.3.1 TESTE DE ESTERILIDADE	25
4.2.3.2 ENSAIO DE ENDOTOXINA	25
4.2.3.3 USO DO BIOINDICADOR RÁPIDO 3M®-1264	26
4.2.4 QUALIFICAÇÃO QUÍMICA RESIDUAL	26
4.2.4.1 ANÁLISE DE SUBPRODUTOS DO ÓXIDO DE ETILENO	26
4.2.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	27
4.2.4.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	27
4.2.4.4 CATEGORIA DO MÉTODO ANALÍTICO	28
4.2.4.5 SELETIVIDADE	28
4.2.4.6 LINEARIDADE	29
4.2.4.7 PRECISÃO INTRA-CORRIDA (REPETIBILIDADE)	30
4.2.4.8 PRECISÃO INTER-CORRIDA (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)	30
4.2.4.9 EXATIDÃO	30
4.2.4.10 ROBUSTEZ	30
4.2.4.11 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	31
4.2.4.12 INTERVALO	32
4.2.4.13 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE AERAÇÃO	32
5 – RESULTADOS	33
5.1 PRÉ-QUALIFICAÇÃO	33
5.2 QUALIFICAÇÃO FÍSICA	33
5.2.1 USO DOS SENSORES FÍSICOS COMPETEC®.	33
5.2.2 USO DOS INTEGRADORES QUÍMICOS - CLASSE IV	34
5.3 QUALIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA	34
5.3.1 TESTE DE ESTERILIDADE	34
5.3.2 ENSAIO DE ENDOTOXINA	35
5.3.3 BIOINDICADOR RÁPIDO 1294	35
5.4 QUALIFICAÇÃO QUÍMICA	35
5.4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	35
5.4.2 SELETIVIDADE	36
5.4.3 LINEARIDADE	37
5.4.4 PRECISÃO INTRA-CORRIDA	39
5.4.5 PRECISÃO INTER-CORRIDAS	39
5.4.6 EXATIDÃO	40

5.4.7 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	40
5.4.8 INTERVALO	40
5.4.9 ROBUSTEZ	41
5.4.10 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE AERAÇÃO	41
5.4.11 APROVAÇÃO RESIDUAL A PARTIR DO TEMPO DE 6 HORAS	42
6 - DISCUSSÃO	44
7 - CONCLUSÃO	47
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9 - APÊNDICES	53

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura molecular do óxido de etileno C_2H_4O (DEMARZO, 1997). 17
- Figura 2.** Amostragem (Parte A) para qualificação física e microbiológica em onze posições: 1DA, 1AD, 2AA, 2DD, 3AC, 3CC, 3DC, 4AD, 4DA, 5AA, 5DD e amostragem (Parte B) para qualificação química em três posições: 1 (Porta de entrada), 2 (Centro) e 3 (Porta de saída), *Software AUTOCAD 5.0* 23
- Figura 3:** Qualificação de instalação e operação para ciclo de esterilização (BRASIL, 1999; ABNT-NBR 15245, 2005). 24
- Figura 4.** Gráfico dos parâmetros de esterilização COMPETEC, 2009. 33
- Figura 5.** Curva de morte microbiana, *Bacillus atropheaus* (esporo) para o tempo total de esterilização 360 min. ou 6 h de exposição ao agente esterilizante EtO. 35
- Figura 6.** Cromatogramas (A) Padrão de trabalho EtO 10 μ g/ml, (B) do diluente Acetona. 36
- Figura 7.** Linearidade calculada das áreas médias em triplicata dos cromatogramas: 2,729 \pm 0,073, 6,044 \pm 0,257, 13,585 \pm 0,495, 23,762 \pm 0,609, 37,572 \pm 0,303, 47,905 \pm 0,362 e 61,272 \pm 0,203. 37
- Figura 8:** Representação gráfica da correlação entre a área e concentração das soluções de Óxido de Etileno nos níveis de concentração testados de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g/ml para aprovação da linearidade do método analítico (*Programa Microsoft Office Excel, 2007*). 38
- Figura 9:** Cromatogramas da linearidade dos padrões de óxido de etileno nas concentrações respectivas de 1 μ g/ml, 10 μ g/ml e 50 μ g/ml. 38
- Figura 10:** Regressão residual significativa para todos os tempos analisados, $P < 0,05$. 42
- Figura 11.** A partir do tempo de aeração 6 horas a concentração residual nos frascos ficaram abaixo do limite 10 μ g/ml, sendo o tempo mais próximo ao resultado do Bioindicador Rápido de 4 horas, * $P < 0,05$. 43

Lista de Quadros

Quadro 1. Teste de seletividade através de testes de degradação do EtO	28
Quadro 2. Teste de linearidade, diluição para curva de calibração.	29
Quadro 3. Variação nos parâmetros nominais para determinar a robustez	31
Quadro 4. Metodologias (R1 a R8) obtidas da variação dos parâmetros nominais.	31

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultado para testes do integrador químico para os ciclos 534, 535 e 536	34
Tabela 2. Resultado do teste de esterilidade 14 dias – ciclos: 534, 535 e 536.	34
Tabela 3: Avaliação da degradação forçada de Óxido de Etileno	36
Tabela 4: Área obtida para linearidade nos diversos níveis de concentração EtO	37
Tabela 6: Resultados de repetibilidade (Precisão intra-corrída).	39
Tabela 7: Avaliação e aprovação da precisão inter-corrída.	39
Tabela 8: Resultados de exatidão nos diversos níveis de concentração de óxido de etileno avaliados	40
Tabela 9. Combinação ensaiada por conveniência para determinar a concentração do padrão de trabalho nas metodologias: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8.	41
Tabela 10: Resultados das análises cromatográficas dos frascos enterais aerados nos tempos 0, 4, 6, 12, 24 e 48 horas para o limite residual de 10 µg/ml.	41

Lista de Abreviaturas

Aa	Área da amostra
a	Inclinação da curva
Ap	Área do pico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Interseção
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CMD	Concentração Média Determinada
CME	Concentração Média Experimental
CLP	Controle Lógico Programado
DP	Desvio Padrão
DPR%	Desvio Padrão Relativo
E%	Exatidão
EtC	Etilenocloridrina
EtG	Etilenoglicol
EtO	Óxido de etileno
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
IHM	Interface Homem Máquina
LAL	Reagente de Lisado para Peptídeo Específico
LIQ	Limite de quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
Vd	Valor Determinado
Vt	Valor Teórico
R%	Recuperação
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>

1 - INTRODUÇÃO

A nutrição enteral é um método seguro para prover nutrientes e fornecer suporte nutricional a indivíduos que não têm condições de se alimentar por via oral, mas que tenham um trato gastrintestinal funcionante (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O frasco enteral estéril é um produto farmacêutico de polietileno, classificado como de uso único, ou seja, descartável. A nutrição enteral utiliza estes frascos para a alimentação de pacientes através de uma dieta especificamente elaborada com nutrientes. A administração da dieta ou do produto contaminado por microrganismos pode causar distúrbios gastrintestinais como náuseas, vômitos ou diarréias severas (OKUMA *et al.*, 2000; BRASIL, 2004).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) determinam que a empresa fabricante de produtos farmacêuticos estéreis deve comprovar que todos os aspectos críticos do processo de produção e esterilização sejam controlados, certificando a esterilidade através de validação. Os processos foram validados através de atos documentados que atestam a consistência e a confiança dos resultados de acordo com a legislação e os critérios de aceitação para qualidade (BRASIL, 2003; Brasil, 2004; ABNT NBR 15245, 2005).

A esterilização utiliza-se de agentes químicos ou físicos para destruir todas as formas de vida microbiana. A esterilidade pode ser introduzida nos produtos mediante a aplicação de calor seco (estufa), calor úmido (vapor saturado sob pressão), imersão química (glutaraldeído), retenção física (filtração) ou através de agentes gasosos, como o óxido de etileno (RUTALA *et al.*, 1997).

O gás óxido de etileno (*EtO*) é um composto conhecido como éter cíclico utilizado desde a década de cinquenta para esterilizar materiais médico-hospitalares sensíveis ao calor (GOVEIA *et al.*, 2007). O *EtO* atua como método de esterilização química, altamente viruscida, esporicida e fungicida. Sua ação é dependente dos parâmetros de concentração, temperatura, umidade relativa e tempo de exposição ao gás (BERTANI *et al.*, 2008).

Para o controle dos parâmetros de esterilização e a ação biológica do óxido de etileno são utilizados bioindicadores (FERRAZ, 1988). O microrganismo *Bacillus atrophaeus*, é uma bactéria formadora de esporos, altamente resistente ao óxido de etileno, por isso é empregado em seu controle biológico. O bioindicador de 1ª

geração era constituído de esporos depositados em tiras de papel e embalados individualmente em envelope (PINTO e SAITO, 1992), o bioindicador de 2ª geração, denominado convencional foi desenvolvido por método de mudança de pH e coloração do substrato fermentado (*Attest 1294*), com resultado em 48 horas. O bioindicador de 3ª geração (*Attest rapid 1294*) permite obter resultado de esterilização em 4 horas. A resposta consiste em reação enzimática do microrganismo sobre o substrato com marcador fluorescente, detectável na luz ultravioleta da incubadora rápida, o que representa ganho de tempo na análise quando comparado ao bioindicador convencional (3M, 2008).

Para retirar o óxido de etileno residual da autoclave realiza-se vácuo e pulsos de ar denominados de remoção mecânica, o que reduz o tempo de aeração (THOMAS, 1971; TOCK e CHEN, 1974; VINK *et al.*, 1986; POSSARI, 2003). Após a esterilização e remoção mecânica de *EtO*, retiram-se os bioindicadores para controle de processo e os produtos esterilizados foram submetidos à aeração ambiental e quantificação residual por cromatografia a gás para determinar o tempo de aeração (BRASIL, 1999; POSSARI, 2003).

Para determinar o tempo de aeração o presente estudo propôs desenvolver a validação da esterilização por óxido de etileno em frasco enteral através de técnicas de qualificação física, microbiológica e química, utilizando a tecnologia do bioindicador rápido e cromatografia a gás.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

A nutrição enteral preserva a imunidade e os mecanismos de defesa dos pacientes, sendo segura, econômica e é amplamente utilizada, quando comparada com a nutrição parenteral (OKUMA *et al.*, 2000). É um suporte nutricional sendo importante ferramenta terapêutica para pacientes que apresentam distúrbios gastrintestinais graves, lesões do sistema nervoso, depressão, câncer ou foram submetidos a procedimentos cirúrgicos (RIBEIRO, 2000).

As dietas enterais, realizadas através de frascos enterais, equipos e sondas são ricas em macro e micronutrientes, sendo, portanto, excelentes meios para crescimento de microrganismos (OLIVEIRA e WAITZBERG, 2001). Devemos seguir procedimentos criteriosos para controlar a produção relacionada à fabricação e esterilização de produtos para torná-los isentos de contaminações biológicas, químicas e físicas (SIMON *et al.*, 2007).

A presença de qualquer microrganismo indica que o produto não está estéril. Convencionalmente considera-se que a probabilidade de sobrevivência dos microrganismos contaminantes seja 1:1.000.000, carga microbiana 10^6 (BERTANI *et al.*, 2008). Porém, para atingir a segurança de esterilidade é necessária a redução de 12 vezes da carga de microrganismos contaminantes iniciais (10^6), ou seja, 12 ciclos logarítmicos para atingir o *Sterility Assurance Level* (SAL 10^{-6}) (PADOVEZE, 2003).

Estudos realizados confirmam que a carga de microrganismos em produtos farmacêuticos e médico-hospitalares não é eliminada toda de uma vez, e sim gradativamente. A carga microbiana (*bioburden*) é eliminada em curva exponencial pelo tempo, sendo um importante parâmetro para avaliar a eficácia dos métodos de esterilização (GRAZIANO, 2000; GRAHAM, 1997).

Estudo realizado no Canadá avaliou a eficácia dos métodos de esterilização à baixa temperatura como o óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio e vapor de peróxido de hidrogênio. Todos os métodos apresentaram resultados efetivos, apresentando eficácia na redução das cepas microbianas testadas (ALFA *et al.*, 1996).

Outros estudos avaliaram o processo de esterilização por óxido de etileno comparando sua eficiência com processos de esterilização por ácido peracético e

plasma peróxido de hidrogênio. Os produtos médicos avaliados apresentavam a extensão de 40 cm e lúmen menor que 3 mm de diâmetro. Todos os métodos apresentaram resultados satisfatórios referente à esterilidade (RUTALA, GERGEN E WEBER, 1998).

Segundo Bathina *et al.* (1998) que estudaram a reutilização de cateteres eletrofisiológicos de uso único e de alto custo esterilizados em baixa temperatura nos testes de esterilidade realizados não se encontrou fontes de contaminação. Os autores concluem que para um reuso seguro é necessário maiores estudos, principalmente referentes à dificuldade de testar todas as marcas comerciais existentes no mercado.

Outro estudo referente à reutilização de produtos considerados de uso único foi conduzido por pesquisadores do *FDA*. Este estudo avaliou o efeito de diferentes processos de esterilização em baixas temperaturas sobre os materiais utilizados para a fabricação destes artigos. Materiais como o látex, silicone, poliuretano, *nylon* e o polietileno foram avaliados quanto à força tênsil. Os resultados demonstraram que o silicone é minimamente afetado enquanto o látex, o polietileno e o *nylon* utilizados na maioria dos produtos farmacêuticos tiveram a força tênsil reduzida. O poliuretano apresentou alterações, fragilizando a força tênsil. Este estudo demonstrou limitações e falta de segurança relacionada à reutilização de produtos farmacêuticos (BROWN *et al.*, 2002).

Em muitas cirurgias ortopédicas são utilizados perfuradores elétricos e pneumáticos de uso doméstico, existindo o risco de contaminação por sangue ou resíduos orgânicos derivados destes procedimentos. Um estudo avaliou a eficácia da esterilização por óxido de etileno de furadeiras novas intencionalmente contaminadas com esporo de *Bacillus atrophaeus* e obteve o resultado de 99,99% de eficiência, comprovando a eficácia da esterilização por óxido de etileno em materiais sensíveis a outros métodos de esterilização (GOUVEIA *et al.*, 2009).

Em alguns experimentos, o óxido de etileno (*EtO*) foi considerado padrão ouro para esterilização de equipamentos termossensíveis e elétricos. Concluiu-se que, produtos farmacêuticos e equipamentos médicos utilizados em procedimentos cirúrgicos foram totalmente livres de microrganismos e a esterilização por óxido de etileno constitui um importante papel no controle de infecções, seja na reutilização

segura ou em produtos de uso único (MUSA, 2002; CAMPOCCIA *et al.*, 2006; D'LIA *et al.*, 2007).

O óxido de etileno, internacionalmente conhecido como *EtO* (Figura 1) foi sintetizado por *Wurtz* em 1859 (DEMARZO, 1997) e produzido comercialmente em 1921, onde foi utilizado na pulverização de produtos têxteis, livros e na agricultura como inseticida (COTTON e ROARK, 1928). Indústrias passaram a utilizá-lo como esterilizante de alimentos e condimentos importados em 1949. Após a 2ª Guerra Mundial, cientistas iniciaram pesquisas com o óxido de etileno em busca de um gás esterilizante para produtos hospitalares (NOGUEIRA, *et al.*, 1984). A partir de 1962 foi adotado como método de esterilização para materiais sensíveis ao calor, devido às características bactericidas e esporicida, eficácia em temperatura baixa e alto poder de penetração (HERANCE *et al.*, 1990).

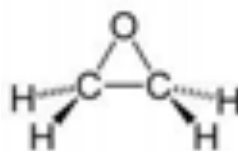


Figura 1. Estrutura molecular do óxido de etileno - C₂H₄O (DEMARZO, 1997).

O *EtO* dissolve-se prontamente em água e em solventes orgânicos e não é corrosivo para a maior parte dos artigos, com exceção de algumas borrachas. É obtido em escala industrial através da oxidação catalítica direta do etileno (RIBEIRO, 2000; LONGHI, 1994), sendo capaz de esterilizar de uma grande variedade de produtos médico-hospitalares, os quais seriam danificados através do calor seco ou vapor saturado sob pressão (POSSARI, 2003). O *EtO* é um gás altamente explosivo e facilmente inflamável, devendo ser utilizado em equipamentos especiais denominados autoclaves. Sua ação letal é atribuída à alquilação (reação da substituição de átomos de H por radicais C_nH_{2n+1} dos grupos sulfidril (SH⁻) e hidroxil (OH⁻), existentes em proteínas, ácidos nucleicos, peptídeos, aminoácidos e enzimas, impedindo a síntese de proteínas específicas (ZANON, 1987).

Estudos com animais expostos ao vapor residual de óxido de etileno por mais de dois anos demonstraram aumento de certos tumores malignos como leucemia e câncer de estômago (MARÍN e GALLÉN, 1987). Outros estudos comprovaram a fototoxicidade e embriotoxicidade para níveis acima de 125 ppm (THIESS *et al.*, 1981; MORGAN *et al.*, 1981). Cuidados foram tomados em função da

sua toxicidade, pois pesquisas indicam que o gás óxido de etileno também pode ser carcinogênico, mutagênico e neurotóxico. Seus resíduos podem causar queimaduras das mucosas e lesões graves aos pacientes, podendo ainda levar a riscos ocupacionais, caso não se respeitem as condições de segurança e aeração (MARTINS, 2003; POSSARI, 2003; BERTANI *et al.*, 2008).

A aeração é um sistema de renovação de ar e retirada de óxido de etileno residual. Este processo é realizado em sala controlada, independente, de uso restrito, sob pressão negativa e deve garantir no mínimo 25 trocas de ar/h (BRASIL, 1999). A eficiência do fluxo de ar quente (55°C) na sala de aeração foi estudada e permitiu reduzir os resíduos de óxido de etileno em menor tempo quando comparado a aeração em temperatura ambiente (MATTHEWS *et al.*, 1989).

De acordo com a Portaria Interministerial 482 (BRASIL, 2003) o Limite de tolerância de *EtO* máximo permitido em artigos médico-hospitalares é de 25 ppm para correlatos que contatam com o sangue. A Farmacopéia Americana (*USP 30*, 2007) determina que o limite residual de óxido de etileno em produtos farmacêuticos como o frasco enteral devem estar abaixo do limite de 10 ppm. A validação do processo de esterilização deve comprovar a esterilidade através de qualificação física, microbiológica e química (BRASIL, 1999; BRASIL 2003; ABNT NBR 15245, 2005).

A qualificação física deve ser usada para identificar características críticas para a investigação dos parâmetros de umidade relativa, temperatura, tempo de exposição ao óxido de etileno e pressão através do uso de sensores que permitam verificar as condições dentro da autoclave e fornecer um perfil completo das condições da carga esterilizada. Deve-se utilizar 10 sensores para 5m³ de autoclave e no mínimo um sensor adicional por 1m³ adicional (ABNT NBR 13849, 1997; ABNT NBR 15245, 2005).

A qualificação microbiológica deve utilizar o controle biológico de processo, este controle deve ser realizado com organismos-teste, resistentes ao óxido de etileno como o *Bacillus subtilis* ou *Bacillus atropheus* (ABNT NBR 11138-2, 2004) e para acompanhar testes farmacopéicos como esterilidade e ensaios de endotoxina para confirmar a segurança do processo de esterilização (COOPER e JORDAN, 2000; MARTINS *et al.*, 2003; ABNT NBR 11138-2, 2004; SILVA e PINTO, 2005; USP 30, 2007).

A qualificação química deve determinar o tempo de aeração através do método de análise cromatografia a gás (*GCFID*), utilizado para a quantificação residual de óxido de etileno no produto farmacêutico frasco enteral (USP 30, 2007). A utilização de método validado demonstra que os resultados são confiáveis e adequados à finalidade pretendida, sendo uma condição essencial para a avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos. Na sua utilização destes produtos espera-se que sua ação esteja preservada e que a toxicidade mantenha-se em níveis aceitáveis (MARTINS *et al.*, 2003; NAGAROTO e VESSONI, 2006; SILVA *et al.*, 2010).

Cromatografia a gás é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás denominado de fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica) onde ocorre a separação da mistura. As substâncias que têm a maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, por tanto, separadas daquelas de menor interação, posteriormente detectadas e quantificadas através do detector de ionização de chama (*FID*). Este detector consiste em uma chama de hidrogênio (H_2) e ar sintético. O efluente passa da coluna do CG através da chama, a qual divide em moléculas orgânicas e produz íons (PEREIRA e NETO, 2000; MARTINS *et al.*, 2003; OHASHI, 2006; NAGAROTO e VESSONI, 2006).

A validação do método de análise (*GC*) através de detector (*FID*) é recomendada pela RE 899 da ANVISA (BRASIL, 2003) à qual se reporta para metodologia de quantificação de fármacos em medicamentos que sejam avaliados na categoria 2 para os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão intra-dia e inter-dias, exatidão, robustez, limite de detecção, limite de quantificação e intervalo. A validação da metodologia analítica deve utilizar análises em triplicata para elaborar resultados confiáveis com pontos médios, cálculo do desvio padrão e desvio padrão relativo para aprovação conforme critérios de aceitação (USP 30, 2007; SILVA *et al.*, 2010) para quantificar o óxido de etileno residual e determinar o tempo de aeração em frascos enterais esterilizados.

3 - OBJETIVO

3.1 – OBJETIVO GERAL

Determinar do tempo de aeração residual em frascos enterais esterilizados por óxido de etileno.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o processo de esterilização em frascos enterais para avaliar a eficiência do bioindicador rápido (4h) através da qualificação física e microbiológica.

- Realizar a qualificação química residual através da validação do método de análise (*GCFID*) para determinar o tempo de aeração em frasco enteral no limite de 10 ppm.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

4.1.1 - Amostra

- Frascos Enterais de 300 ml, fabricados em polietileno de baixa densidade pela FBMFARMA indústria farmacêutica, lotes 80334, 80335, 80336.

4.1.2 – Equipamento

- Autoclave: câmara para esterilização produzida em aço inoxidável 316, de fronteira (duas portas), volume 6,0 m³, fabricante FBMFARMA® (ABNT NBR 13849, 1997).

- Cromatógrafo Gasoso *YOUNG LIN*®, modelo: 6100 Series, com *software* de controle e aquisição de dados *Windows Vista*®, composto por: forno para coluna, injetor capilar Split/Splitless e injetor automático para 110 amostras com detector de chama por ionização (FID).

- Coluna: *Zebron ZB Wax*®: capilar, polietilenoglicol, referência: 7HG -G007-11, code: 080949301, número: 148285, dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25 µm (filme).

- Incubadora rápida *3M*®: leitura por luz ultravioleta, resultado em 4 horas.

4.1.3 – Outros materiais

- Água Milli-Q: ultra pura, filtro 0,22 µm.

- Balão volumétrico: volume de 50 ml e 100 ml.

- Béquer: volume 1000 ml, 500 ml e 250 ml.

- Bioindicador Rápido 1294: *Bacillus atrophaeus*, ATCC 9372, *3M*®.

- Caixas de papelão: medidas 430mm x 285mm x 370mm.

- Clipador: modelo *WHEATON E-Z CRIMPER*®.

- Declipador: *KEBBY DECAPPER®*.
- Filme oclusivo elástico: *Parafilm "M" – LABORATORY FILM®*.
- Fluxo laminar: capela exaustão, classe 100 – *TROX®*.
- Integrador químico *BROWNE®*: monitoramento multiparamétrico.
- Luvas nitrílicas *3M®*.
- Máscara facial *3M®*: 6899-B, com Filtro para vapor orgânico.
- Padrão óxido de etileno: solvente acetona, volume 25 ml, concentração 0,5% pv. (*SOLUTECH®*), lote: 2695/09 e 2696/09
- Papel grau cirúrgico *REXAN®*: conforme ABNT NBR 14990-3, 2003.
- Pipeta Automática: *LABMATE* 100 e 300 µL.
- Ponteira descartável.
- Proveta de 100 ml e 200 ml.
- Seringas descartáveis: com agulhas, volume de 5 ml.
- Vial 1 ml: *FLOW SUPPLY®*, tampa, 11 mm, *ACC CAPTIS®*.

4.2 – MÉTODOS

4.2.1- Descrição do estudo e análise estatística

Trata-se de estudo descritivo e quantitativo realizado na FBMFARMA indústria farmacêutica LTDA. em Anápolis-GO, Brasil.

Foram realizados estudos de validação do processo de esterilização através da qualificação de instalação, operação e Desempenho física, microbiológica e química residual. Os resultados foram expressos em média \pm DP e DPR% através do Programa *Microsoft Office Excel* (2007) e analisados estatisticamente pelos Programas *GRAPHPAD INSTAT 3.0* (teste *Turkey-Kramer*) e *BIOSTAT 4.0* (teste *Shapiro-Wilk*), considerado significativo valores de $p < 0,05$.

4.2.2 - Amostragem

Para a qualificação física e microbiológica foram utilizados Sensores, integradores químicos e bioindicadores colocados juntamente com as 66 amostras para testes de esterilidade e ensaios de endotoxina, conforme figura 2 parte A, nas posições: 1DA, 1AD, 2AA, 2DD, 3AC, 3CC, 3DC, 4AD, 4DA, 5AA e 5DD. Para a qualificação química foram utilizados 54 Frascos Enteriais para determinar o tempo

de aeração nos intervalos de 0, 4, 6, 12, 24 e 48 horas conforme Figura 2, parte B, nas posições: 1 – Porta de entrada, 2 – Centro e 3 – Porta de saída da autoclave.

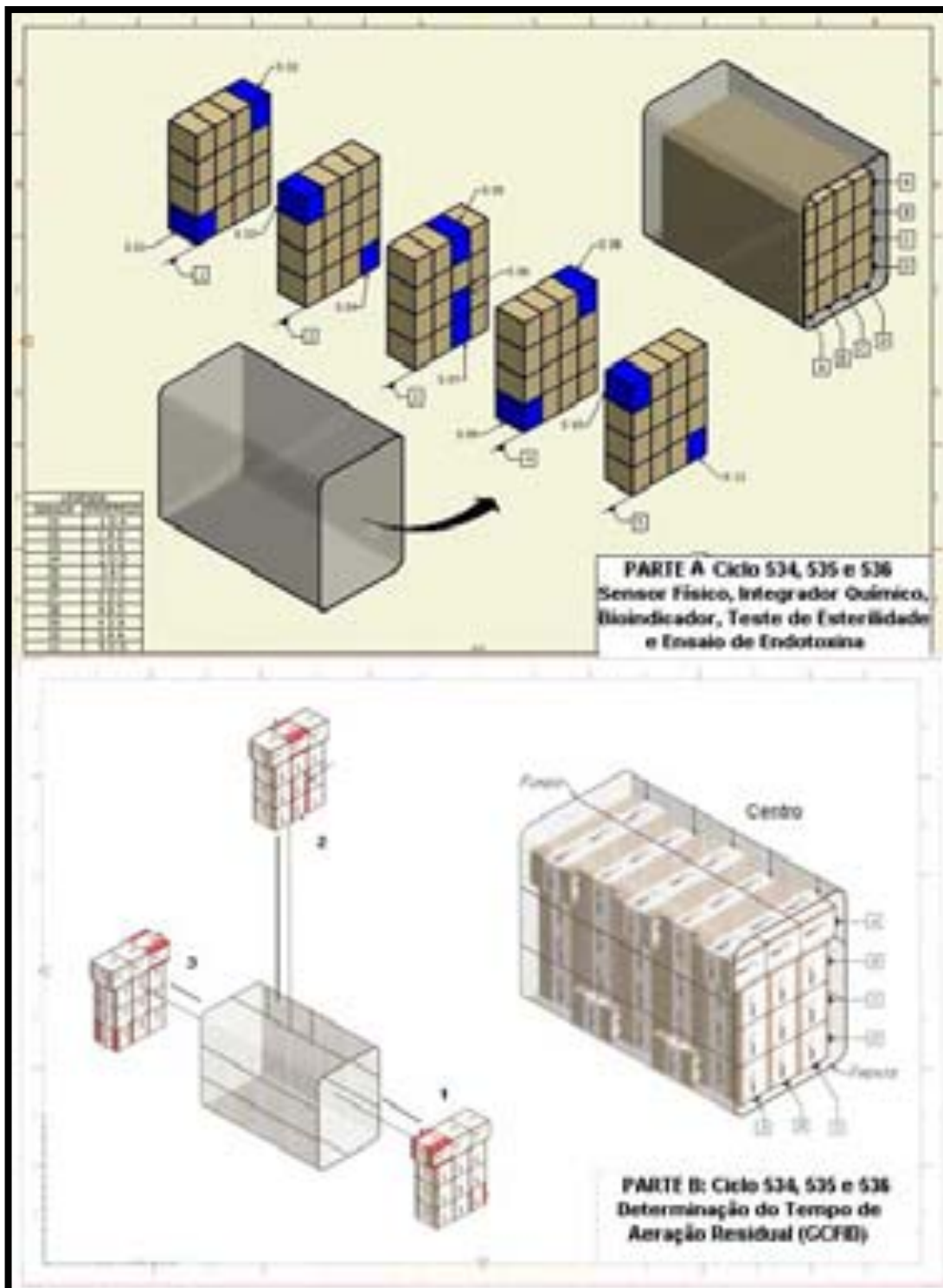


Figura 2. Amostragem (Parte A) para qualificação física e microbiológica em onze posições: 1DA, 1AD, 2AA, 2DD, 3AC, 3CC, 3DC, 4AD, 4DA, 5AA, 5DD e amostragem (Parte B) para qualificação química em três posições: 1 (Porta de entrada), 2 (Centro) e 3 (Porta de saída), *Software AUTOCAD 5.0*

4.2.3 - Pré-Qualificação

A manutenção e calibração dos equipamentos foram estabelecidas e documentadas para os sistemas de funcionamento da autoclave. As qualificações de instalação e operação foram realizadas conforme figura 3, através de empresa terceirizada, COMPETEC® de acordo com as Boas Práticas de Esterilização e organograma da Figura 3 (BRASIL, 1999; ABNT-NBR 15245, 2005)

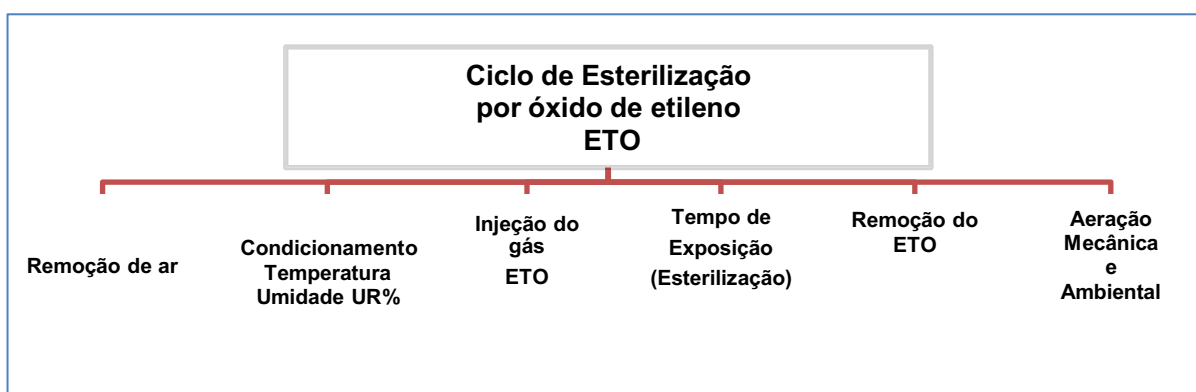


Figura 3: Qualificação de instalação e operação para ciclo de esterilização (BRASIL, 1999; ABNT-NBR 15245, 2005).

4.2.3 - Qualificação Física

A autoclave foi carregada utilizando 90% do volume com 80 caixas, sendo 4.000 frascos enteral de 300 ml, embalados em papel grau cirúrgico (ABNT-NBR12946, 2001), para cada ciclo de esterilização monitorado através dos sensores físicos e integradores químicos multiparamétricos.

4.2.3.1 - Uso dos Sensores Físicos COMPETEC®.

Para a qualificação física foi avaliado o desempenho do processo de esterilização monitorando através de onze sensores de temperatura, umidade, pressão e concentração do óxido de etileno para os critérios de aceitação: temperatura de $55^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, umidade relativa ≥ 35 UR%, pressão EtO $0,700 \text{ Kg/cm}^2$ a $0,800 \text{ Kg/cm}^2$, concentração $430 \text{ mg/L} \pm 10\%$.

Os sensores foram implantados na autoclave nas posições: 1DA, 1AD, 2AA, 2DD, 3AC, 3CC, 3DC, 4AD, 4DA, 5AA e 5DD e registraram todos os parâmetros durante todo o período de 06 horas de exposição para três ciclos consecutivos monitorados pela *COMPETEC*®.

4.2.3.2 - Uso dos Integradores Químicos - Classe IV

Para avaliar a qualificação dos parâmetros de esterilização foram utilizados por ciclo onze integradores físico-químicos (*BROWNE*®), classe IV para avaliar a concentração do gás, temperatura, umidade e tempo de exposição da carga.

Os integradores físico-químicos foram posicionados juntamente com os sensores físicos e os critérios de aceitação foram os mesmos utilizados pelos sensores físicos.

4.2.3 - Qualificação Microbiológica

4.2.3.1 - Teste de Esterilidade

A metodologia consistiu de 11 amostras de frascos enterais por ciclo, totalizando 33 amostras para os ciclos: 534, 535 e 536. Os testes de esterilidade foram realizados conforme metodologia (*USP 30, 2007*).

Os frascos foram cortados com tesouras estéreis e os fragmentos obtidos transferidos para tubos de ensaios de 80 ml através da filtração por membrana asséptica. Posteriormente submetidos conforme testes farmacopéicos (*USP 30, 2007*) ao meio de cultura caldo tioglicolato (*OXOID*®), para detecção de bactérias aeróbias e anaeróbias na temperatura de 30-35°C e caldo de caseína de soja (*TSB*) na temperatura de 20-25°C para detecção de bolores e levedura (*AZEVEDO e CRUZ, 2006*). A incubação foi realizada por 14 dias através do Laboratório *MEDLAB*®, credenciado rede REBLAS.

4.2.3.2 - Ensaio de Endotoxina

Esta metodologia utilizou 11 amostras para ensaio de endotoxina, totalizando 33 amostras para os ciclos 534, 535 e 536. Os testes foram realizados conforme metodologia descrita (*USP 30, 2007*) em método quantitativo a partir de

cromóforos liberados pela reação da endotoxina com o reagente de *LAL* (lote: GL088V) empregado para determinação quantitativa de endotoxina pelo método de análise cinética turbidimétrica com sensibilidade $\lambda = 0,5$ UE/ml (COOPER, JORDAN, 2000; SILVA e PINTO, 2005).

O método cinético turbidimétrico empregado utilizou endotoxina bacteriana (Lote: GL0799). As análises foram realizadas pelo Laboratório *MEDLAB*®, e seguem o critério de aprovação: $\lambda < 0,5$ EU/ml.

4.2.3.3 - Uso do Bioindicador Rápido 3M®-1264

Avaliação da eficiência para os 33 Bioindicadores de terceira geração (*ATCC* 9372) foi realizada através do método do fornecedor (*3M*, 2008); incubadora rápida que executa a leitura em 4 horas do substrato fluorescente fermentado pelos esporos do *Bacillus atropheaus* detectável através da luz ultravioleta na temperatura de 37°C conforme metodologia (*3M*, 2008; *ISO* 11138, 2004; *ISO* 11135, 2007).

O critério de aceitação define que todos os bioindicadores esterilizados nos ciclos 534, 535 e 536, juntamente com os frascos enterais devem ter sido eliminados, ou seja, o teste deve apresentar resultado letal positivo. Comprovando a eliminação de toda a carga microbiana inicial 10^6 para o nível de esterilidade segura (*SAL* 10^{-6}), ou seja, redução de 12 ciclos logaritmos pós para a exposição de 6 horas ao agente esterilizante óxido de etileno.

4.2.4 - Qualificação Química Residual

4.2.4.1- Análise de subprodutos do óxido de etileno

O limite para o subproduto etilenoglicol (*EtG*) não foi determinado, pois a avaliação de risco indica que quando resíduos de *EtO* são controlados conforme requerido (10 ppm) é pouco provável que resíduos biologicamente significantes de (*EtG*), estejam presentes (*ISO* 10993-7, 2001).

O subproduto etilenocloridrina (*EtCH*) é formado através de reação química do *EtO* na presença de íons cloreto. A avaliação de risco indica que, se não houver íons cloreto, não haverá a formação significativa deste subproduto, ou seja,

utilizando água de osmose reversa não é necessário o controle de etilenocloridrina (USP, 2007).

4.2.4.2 - Validação do Método

Validação do método analítico por cromatografia a gás com detector (*FID*) Utilizou-se como substância química de referência (SQR) o óxido de etileno padrão (*SOLUTECH*®), pureza 100 %. Para os testes de eficiência cromatográfica e análises de validação do método utilizou como padrão de trabalho o óxido de etileno (10µg/ml) na faixa de aplicação para limite. O padrão primário foi dissolvido em acetona. A análise em *GCFID* utilizou como fase móvel o gás de arraste Nitrogênio e como gases de queima foram utilizados o hidrogênio e ar sintético (*AIR LIQUIDE*®).

O método analítico fundamenta-se na metodologia descrita por Nagaroto e Vessoni (2006) e foi validado seguindo as recomendações da ANVISA, resolução nº899 (BRASIL, 2003), faixa de aplicação conforme limite da (*USP 30, 2007*) utilizando *EtO* como padrão de trabalho no limite de 10 µg/ml.

4.2.4.3 - Condições Cromatográficas

Utilizou-se o sistema de cromatografia a gás *YOUNG LIN*® 6100 series; software *Windows alta vista* e condições cromatográficas conforme condições abaixo: Forno com temperatura inicial de 60°C, com tempo de equilíbrio de 1 minuto, Rampa de 20,00°C por minuto, temperatura final de 230°C e tempo de análise de 11 minutos; coluna (*ZBWax*): fluxo constante arraste de 1,8 ml/ min., pressão inicial: 18 psi e velocidade de 40 cm/s, dimensões de 30mx0,25mmx0,25µm (filme); volume de injeção para 1 µl; integração rampa de sensibilidade de 4,000 inicial, área de injeção de 0,100 inicial e área de rejeição até 0,010 inicial; calibração com relação de diferença de 3%, tipo de curva: linear, injetor modelo *split*, fluxo constante volume de injeção de 2 µl, temperatura de 220°C, pressão de 18,0 psi, fluxo de separação de 16,2 ml/minuto e fluxo total de 21,0 ml/min para gás de arraste nitrogênio na razão do split 10:1, detector de chama por ionização (*FID*) em temperatura de 250°C, fluxo de hidrogênio de 30 ml/min e fluxo de ar sintético de 300 ml/min.

4.2.4.4 - Categoria do método analítico

A validação do método *GCFID* foi estabelecida seguindo as recomendações da RE 899 da ANVISA para categoria II, à qual reporta para metodologia de quantificação de fármaco em medicamentos que sejam avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão intra-corrída e inter-corrídas, exatidão, robustez, limite de detecção, limite de quantificação e intervalo.

4.2.4.5 - Seletividade

A seletividade foi demonstrada preparando-se possíveis produtos de degradação através de hidrólise básica: padrão submetido à solução alcalina (pH > 10,0) por 24 horas; hidrólise ácida: padrão submetido em solução ácida (pH < 2,0) por 24 horas; oxidação: padrão submetido em meio oxidante (H₂O₂ 2%) por 24 horas; temperatura: padrão exposto a temperatura de 60 °C por 24 horas, exposição à luz: padrão exposto em câmara de fotoestabilidade por 1,2 milhões de lux.hora conforme Quadro 1.

Quadro 1. Teste de seletividade através de testes de degradação do EtO.

TESTE SELETIVIDADE - PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	
1. Hidrólise básica	Solução alcalina (pH > 10,0) por 24 h; (NaOH)
2. Hidrólise ácida	Solução ácida (pH < 2,0) por 24 h; (HCl)
3. Oxidação: meio oxidante	Oxidação por 24 h; (H ₂ O ₂ 2%)
4. Temperatura	Estufa: 60 °C por 24 h
5. Exposição à luz	Câmara de fotoestabilidade (1,2 milhão de lux/h)

Além destas análises, para o teste de seletividade foram calculados os parâmetros cromatográficos. Estes parâmetros avaliaram a qualidade e a eficiência da separação do pico de óxido de etileno e do diluente acetona, garantindo que não houve qualquer interferência advinda de outro analito ou excipiente.

A Resolução (R), e fator de simetria (*Tailing Factor* - *TF*) foram calculados a partir dos cromatogramas através das fórmulas:

-

Onde: t_1 e t_2 representam os tempos de retenção, em unidade de tempo (minutos) e W_1 e W_2 : largura do 1º e do 2º pico

Onde: $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% de altura e d é a distância entre o início do pico até seu ponto de inflexão.

Para se obter um pico com simetria adequada, o fator de simetria deve ser menor que 2,0 e resolução maior que 2,0 conforme RE 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

4.2.4.6 - Linearidade

Foram avaliadas as médias \pm DP (desvio padrão) das áreas dos cromatogramas obtidos em triplicata e elaboradas a curva de calibração das análises de óxido de etileno em diferentes concentrações nos intervalos: 10-50-100-200-300-400-500% nas concentrações de análise (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/ml}$). Em seguida deve-se calcular o valor do coeficiente de correlação (R) utilizando-se planilha de cálculo Excel (*Office 2007*), fórmula:

Onde: y : resposta medida; x : concentração; a : inclinação da curva de calibração = sensibilidade; b = interseção com o eixo y quando $x = 0$. Os critérios de aceitação: $R \geq 0,99$ e Desvio Padrão Relativo ($\text{DPR} \leq 5,0$), conforme Quadro 2 (BRASIL, 2003)

Quadro 2. Teste de linearidade, diluição para curva de calibração.

TESTE LINEARIDADE – CURVA DE CALIBRAÇÃO	
Diluição	Observação
1,0 $\mu\text{g/ml}$ (20 μL) EtO – balão (completa: 100 ml água) - 10%	EtO Padrão 0,5% 5000 $\mu\text{g/ml}$ SOLUTECH®
5,0 $\mu\text{g/ml}$ (100 μL) EtO – balão (completa: 100 ml água) - 50%	
10,0 $\mu\text{g/ml}$ (100 μL) EtO – balão (completa: 50 ml água) - LIMITE	Aprovação da Curva: $R \geq 0,99$ e $\text{DPR} < 5,0\%$
20,0 $\mu\text{g/ml}$ (200 μL) EtO – balão (completa: 50 ml água) - 200%	
30,0 $\mu\text{g/ml}$ (300 μL) EtO – balão (completa: 50 ml água) - 300%	
40,0 $\mu\text{g/ml}$ (400 μL) EtO – balão (completa: 50 ml água) - 400%	
50,00 $\mu\text{g/ml}$ (500 μL) EtO – balão (completa: 50 ml água) – 500%	

4.2.4.7 - *Precisão intra-corrída (repetibilidade)*

Para a precisão intra-corrída verificou-se a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo através do mesmo analista, mesma instrumentação e no mesmo dia. Foram preparadas 9 amostras a 100% da concentração de trabalho (10µg/ml) e realizadas as análises para determinar o desvio padrão relativo (DPR%) dos resultados. O critério de aceitação define-se por DPR% ≤5,0% para cromatografia a gás (BRASIL, 2003).

4.2.4.8 - *Precisão inter-corrída (precisão intermediária)*

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre o padrão, utilizando o mesmo método, em dia e com analista diferentes da análise da precisão intra-corrída. Prepara-se 9 amostras a 100% da concentração de trabalho e realiza a análise, agrupando-se estes resultados com os resultados da precisão intra-corrída para determinar o desvio padrão relativo (DPR%) total. O critério de aceitação define-se por DPR% ≤ 5,0% para cromatografia a gás (BRASIL, 2003).

4.2.4.9 - *Exatidão*

O parâmetro de exatidão foi avaliado através 3 Determinações para concentração baixa, média e alta em triplicata. Prepara-se três soluções de amostras de óxido de etileno nas concentrações de 80, 100, e 120 % da concentração de trabalho para verificar a proximidade dos resultados no critério aceitável da RE 899 da ANVISA (BRASIL, 2003), faixa de 98,0 a 102,0%. Obtidos pela técnica (GCFID) em relação ao valor verdadeiro do analito na amostra através da equação: _____

Onde: E%: Exatidão, Vd: Valor Determinado e Vt: Valor Teórico (BRASIL, 2003).

4.2.4.10 - *Robustez*

O método original foi denominado pela letra maiúscula para os parâmetros cromatográficos nominais iniciais (NAGAROTO e VESSONI, 2006). Para a análise de robustez foram realizadas pequenas alterações deliberadas no método inicial

nominal. Estas alterações foram elaboradas por conveniência, denominadas pelas letras minúsculas, para os novos parâmetros cromatográficos conforme Quadro 3.

Quadro 3. Variação nos parâmetros nominais para determinar a robustez

VARIAÇÃO PARA DETERMINAR A ROBUSTEZ (CONVENIÊNCIA)					
Metodologia	Parâmetro	Fator Nominal		Variação	
Cromatografia a gás	Temperatura inicial do forno	A	60 °C	a	70 °C
	Temperatura final do forno	B	230 °C	b	250 °C
	Fluxo da fase móvel	C	1,8 ml/min	c	2,0 ml/min
	Razão/Rampa	D	10:1	d	8:1
	Temperatura do detector	E	250 °C	e	240 °C
	Temperatura do injetor	F	220 °C	f	210 °C
	Volume de injeção	G	2 µL	g	1 µL

Para determinar a robustez foram realizadas análise em triplicata do EtO (concentração limite de trabalho), através de oito novas metodologias (R1 a R8) obtidas no quadro 4. Os resultados das novas metodologias foram avaliados (média±dp) no critério de aceitação: DPR% <5,0% para determinar a robustez do método, Quadro 4 (BRASIL, 2003).

Quadro 4. Metodologias (R1 a R8) obtidas da variação dos parâmetros nominais

Fator	Métodos da matriz de fatores para determinação da robustez							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
A/a	a	A	A	a	A	A	A	a
B/b	b	b	B	B	B	b	B	b
C/c	C	c	C	c	c	C	C	C
D/d	D	D	D	D	D	d	D	d
E/e	E	e	E	E	E	E	e	E
F/f	f	F	f	f	f	f	F	F
G/g	g	G	G	g	G	G	g	g
DPR% ≤ 5,0	[] EtO	[] EtO	[] EtO	[] EtO	[] EtO	[] EtO	[] EtO	[] EtO

4.2.4.11 - Limite de detecção e quantificação

Foi preparado grupos de amostras com concentrações decrescentes até um valor não mais detectável pelo equipamento de forma segura, o que foi determinado como a concentração do ruído de linha de base, este valor foi multiplicado por 3, para se determinar o limite de detecção (BRASIL, 2003)

As mesmas amostras utilizadas para o limite de detecção foi multiplicado pelo fator de 10, gerando o limite de quantificação (BRASIL, 2003).

4.2.4.12 - Intervalo

Determinado pela concentração de trabalho com linearidade, precisão e exatidão adequados para verificação segura da determinação da concentração de Óxido de Etileno na faixa de 80 a 120% da concentração de trabalho (BRASIL, 2003).

4.2.4.13 - Determinação do tempo de aeração

O tempo de aeração que permitir a dissipação residual do EtO nos frascos enterais no limite de 10 µg/ml (*USP 30, 2007*) em relação ao menor tempo, estabelecido na concentração analisada e calculada através dos cromatogramas obtidos (*ISO 11135, 2007*).

As cinqüenta e quatro amostras de frasco enteral foram esterilizados com 430 mg/L de óxido de etileno (*Carbetil® 20%*) durante 6 horas na temperatura de 55°C, UR%≥35 e remoção mecânica residual de 14 pulsos de ar/vácuo na autoclave nos ciclos: 534, 535 e 536 de acordo com as diretrizes da *ISO 11.135, 2007*.

Após a esterilização, as amostras foram colocadas em sala de aeração a 55°C e 27 trocas de ar por hora onde foram retiradas nos tempos: 0, 4, 6, 12, 24 e 48 horas.

Cada amostra foi preparada completando o volume de 300 ml do frasco enteral com água ultra pura (C.E. ≥18.2 Mohm.cm). Considerando o uso simulado de exposição foi realizada a extração de óxido de etileno através do contato de 24 horas (*ISO 10.993-7, 2001*).

Foram injetados no cromatógrafo separadamente 1 µL de solução branco (Diluentes água e acetona), solução padrão de trabalho EtO e soluções das amostras preparadas.

Através das áreas dos picos referentes aos cromatogramas foi calculado o EtO residual, conforme fórmula:

Onde: EtO: valor obtido de óxido de etileno (ppm); Aa: área do pico referente ao EtO obtido na amostra; Ap: área do pico da solução padrão de EtO; Cp: concentração padrão de EtO; V: volume de solução do frasco; P: peso do frasco (gramas).

5 - RESULTADOS

5.1 - Pré-Qualificação

A manutenção verificou e garantiu o correto funcionamento dos terminais de computadores, portas, válvulas, linhas de ar, monitores, sensores, termostatos, filtros, umidificadores, reguladores e equipamentos.

A calibração foi realizada através de empresa terceirizada Competec® e todos os itens que foram verificados, calibrados e aprovados.

Para a qualificação de operação foram verificados todos os documentos de montagem, instalação, manuais, listas de equipamentos, especificações técnicas e livros de registro.

Os sistemas de utilidades, suporte e segurança foram verificados, revisados, testados e aprovados para os parâmetros: temperatura $55^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, umidade relativa ≥ 35 UR%, pressão EtO ($0,700$ Kgf/cm² a $0,800$ Kgf/cm²), concentração 430 mg/L $\pm 10\%$.

5.2 - Qualificação física

5.2.1 - Uso dos sensores físicos COMPETEC®.

A qualificação física foi realizada e aprovada através de onze sensores COMPETEC® para 6h de exposição ao EtO nos critérios: temperatura de $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa ≥ 35 UR%, pressão EtO $0,750 \pm 50$, concentração 430 mg/L $\pm 10\%$, 2 pulsos de nitrogênio e 14 pulsos de ar/vácuo, conforme Figura 4 (ISO 11135, 2007).

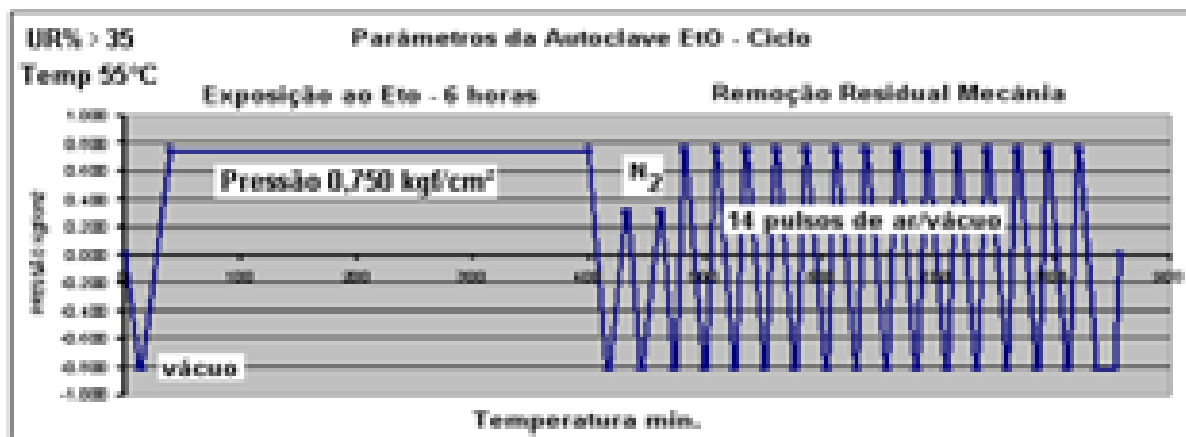


Figura 4. Gráfico dos parâmetros de esterilização – COMPETEC®, 2009.

5.2.2 - Uso dos integradores químicos - classe IV

Foram utilizados e aprovados o uso de onze integradores químicos por ciclo de esterilização, totalizando trinta e três integradores para os três ciclos consecutivos: 534, 535 e 536, conforme Tabela 1 (ISO 11135, 2007).

Tabela 1. Resultado para testes do integrador químico para os ciclos 534, 535 e 536

INTEGRADOR QUÍMICO MULTIPARAMÉTRICO – Classe IV - BROWNE®		
Corrida	Critério de aceitação	Resultado
Ciclo 534	Todos os Integradores Químicos aceitos	Aprovado
Ciclo 535		Aprovado
Ciclo 536		Aprovado

Parâmetros Monitorados e Integrados: temperatura, UR%, concentração e tempo de exposição (EtO)

5.3 - Qualificação microbiológica

5.3.1- Teste de esterilidade

Os testes de esterilidade foram aprovados pelas análises executadas para os ciclos: 534, 535 e 536. No meio de cultura tioglicolato (*OXOID*®) não foi detectado bactérias aeróbias e anaeróbias na temperatura de 30-35°C. Não foram detectados bolores e leveduras no meio de cultura caldo de caseína de soja (*TSB*) na temperatura de 20-25°C, Tabela 2 (*USP 30*, 2007).

Tabela 2. Resultado do teste de esterilidade 14 dias - ciclos: 534, 535 e 536.

Tioglicolato (<i>Thio</i>) (30°C – 35°C)								+C = Crescimento -C = Não houve Crescimento						
Caseína de soja (<i>TSB</i>) (20°C – 25°C)														
Dia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ciclo534	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C
Ciclo535	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C
Ciclo536	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C	-C
Resultado								Estéril						

5.3.2 - Ensaio de endotoxina

Todas as 33 amostras foram aprovadas no ensaio de endotoxina com resultados abaixo de $< 0,5$ EU/ml conforme USP 30 (2007) para os ciclos: 534, 535 e 536 (USP 30, 2007).

5.3.3 - Bioindicador rápido - 1294

As análises dos Bioindicadores rápidos (1294) avaliaram a leitura de 4 horas e os resultados foram aprovados para os ciclos de esterilização 534, 535 e 536. Pois, não ocorreu crescimento dos microrganismos autocontidos nos Bioindicadores rápidos, carga inicial de 1.000.000 esporos (10^6), verificando assim, a eficiência para o controle biológico do processo. O tempo de 6 h de esterilização foi suficiente para eliminar a carga inicial e reduzir 12 ciclos logarítmicos atingindo-se o SAL 10^{-6} conforme Figura 5 (ISO 11138-2, 2004).

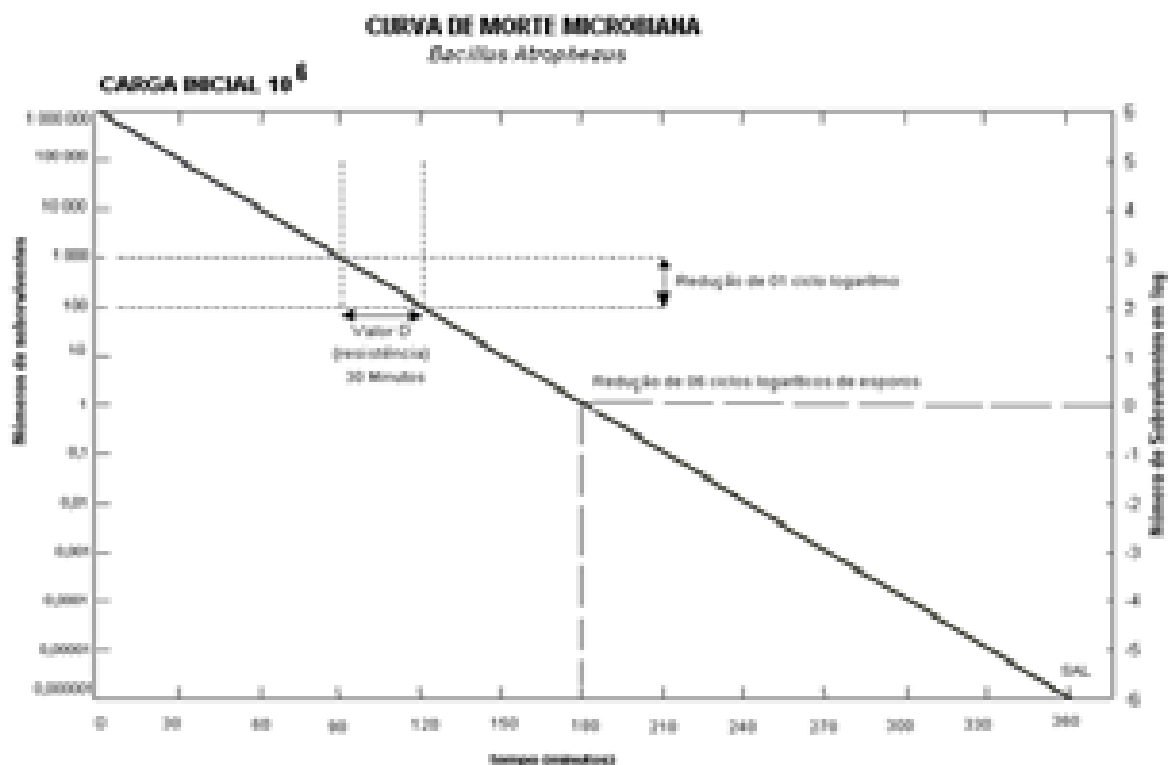


Figura 5. Curva de morte microbiana, *Bacillus atropheus* (esporo) para o tempo total de esterilização 360 min. ou 6 h de exposição ao agente esterilizante EtO.

5.4 - Qualificação química

5.4.1 - Validação do método analítico

5.4.2 - Seletividade

Ocorreu degradações do EtO em meio básico (-40,07%), ácido (-43,68%), oxidante (-23,28%) e sob temperaturas elevadas (-14,77%) conforme Tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da degradação forçada de Óxido de Etileno

DEGRADAÇÃO FORÇADA (EtO)		
Meio de degradação	Concentração inicial	Concentração final (µg/ml)
pH > 10,0 (NaOH 5N)	10,0 µg/ml	6,0045
pH < 2,0 (HCl 5N)		5,6430
Peróxido (H ₂ O ₂ 3,0%)		7,6167
Temperatura (60 °C)		8,5395
Fotodegradação (1,2 x 10 ⁶ Lux.hora)		9,9694 (Controle)
		10,0 (Amostra)

Não ocorreu interferência advinda de produtos de degradação na qualidade e eficiência de separação cromatográfica do analito de interesse (EtO). A comparação dos cromatogramas do padrão e do diluente acetona demonstrou fator de simetria 1,3, resolução 2,5 e ausência de interferentes, Figura 6 (BRASIL, 2003).

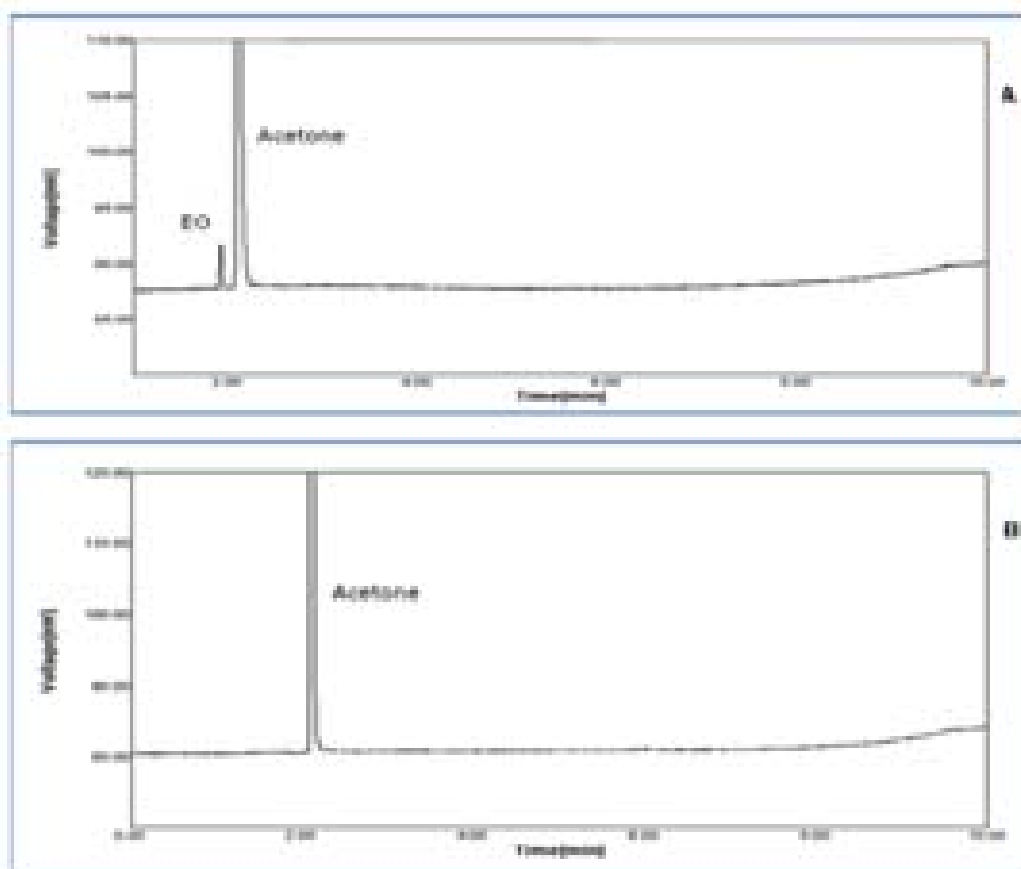


Figura 6. Cromatogramas (A) padrão de trabalho EtO 10µg/ml, (B) do diluente Acetona.

5.4.3 - Linearidade

A análise das amostras apresentou desvio padrão relativo <5 e coeficiente de correlação (R) calculado através as médias das triplicatas foi de 0,999, Figura 7.

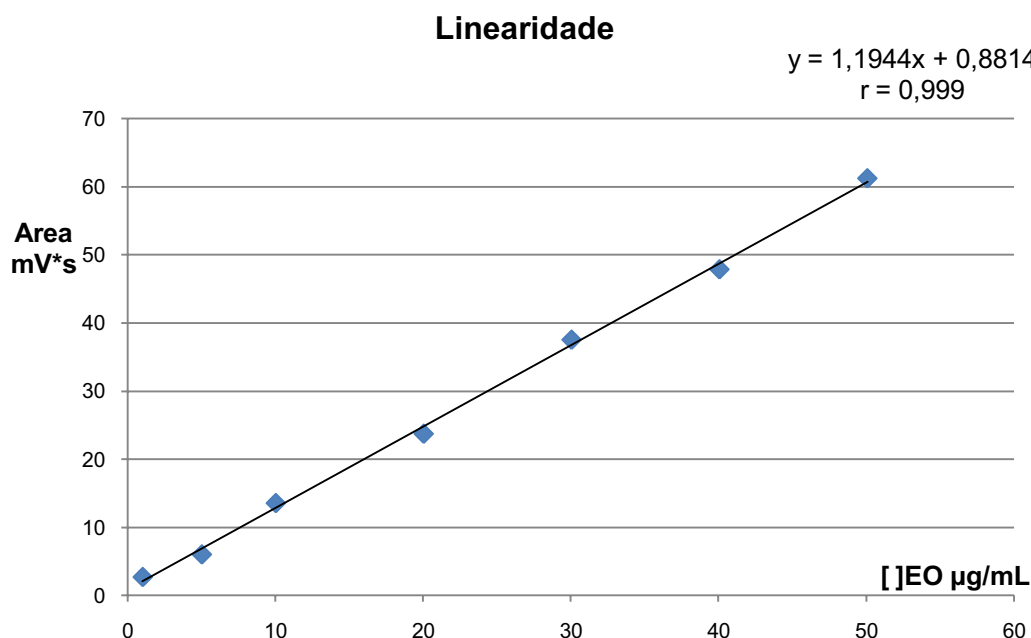


Figura 7. Linearidade calculada das áreas médias em triplicata dos cromatogramas: 2,729 ± 0,073, 6,044 ± 0,257, 13,585 ± 0,495, 23,762 ± 0,609, 37,572 ± 0,303, 47,905 ± 0,362 e 61,272 ± 0,203.

Avaliação da linearidade das amostras apresentou desvio padrão relativo <5% e coeficiente de correlação (r) calculado com as médias das triplicatas de 0,999 conforme Tabela 4 e Figuras 8 e 9 (BRASIL, 2003).

Tabela 4: Área obtida para linearidade nos diversos níveis de concentração EtO.

LINEARIDADE						
Resultados de área obtidos nos diversos níveis de concentração						
Nível (%)	[] µg/ml ppm	Área (mV*s) Corridas			Área (mV*s) Média ± DP	DPR%
		1	2	3		
1	1,00	2,763	2,645	2,779	2,729 ± 0,073	2,7
50	5,00	5,999	6,321	5,812	6,044 ± 0,257	4,2542
100	10,00	13,881	13,013	13,860	13,585 ± 0,495	3,6484
200	20,00	24,465	23,441	23,380	23,762 ± 0,609	2,5658
300	30,00	37,834	37,642	37,240	37,572 ± 0,303	0,80711
400	40,00	48,324	47,693	47,699	47,905 ± 0,362	0,75598
500	50,00	61,254	61,079	61,484	61,272 ± 0,203	0,3314

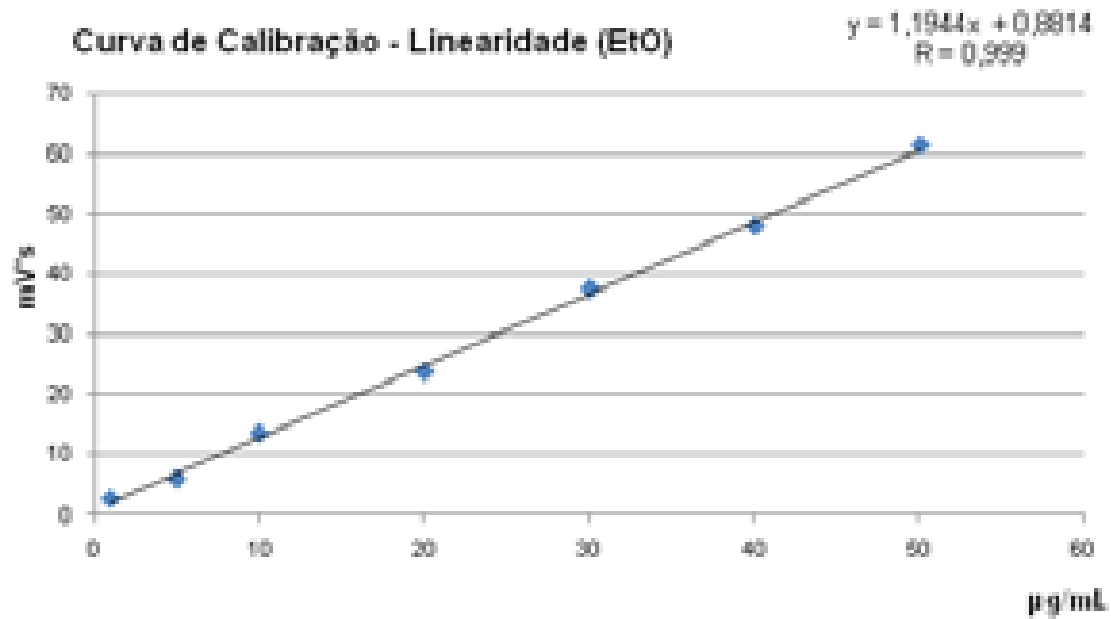


Figura 8: Representação gráfica da correlação entre a área e concentração das soluções de Óxido de Etileno nos níveis de concentração testados de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml para aprovação da linearidade do método analítico (*Programa Microsoft Office Excel, 2007*).

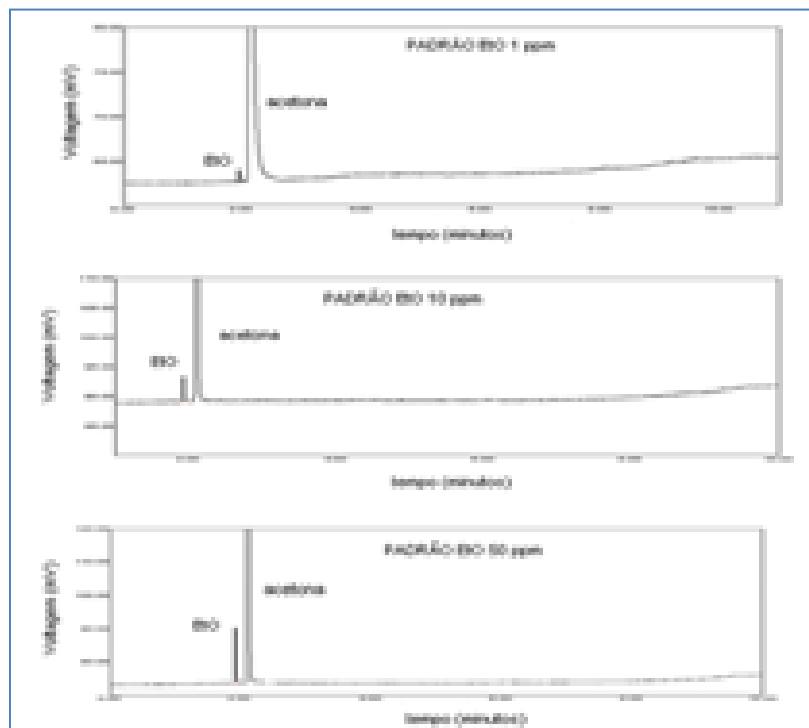


Figura 9: Cromatogramas da linearidade dos padrões de óxido de etileno nas concentrações respectivas de 1 µg/ml, 10 µg/ml e 50 µg/ml.

5.4.4 - Precisão intra-corrída

Análise da Precisão intra-corrída para 9 amostras na concentração de trabalho, no mesmo dia e mesmo analista, (DPR%) das amostras consideradas foi menor que 5,0%, o que indica repetibilidade satisfatória para a aplicação pretendida conforme Tabela 6 (BRASIL, 2003).

Tabela 6: Resultados de repetibilidade (Precisão intra-corrída).

Amostra	Concentração (µg/ml)	Média (A1-A9) ± SD	*DPR %
A1	10,45	10,74 ± 0,17	1,6
A2	10,82		
A3	10,63		
A4	10,94		
A5	10,86		
A6	10,67		
A7	10,99		
A8	10,69		
A9	10,65		
Critério de aceitação: DPR < 5,0%		Repetibilidade Satisfatória	

5.4.5 - Precisão inter-corrídas

O grau de concordância dos resultados obtidos com a análise do padrão EtO de trabalho tanto nos ensaios intra-corrída como inter-corrída, encontram-se na Tabela 7. O valor do DPR % em ambos os casos foi menor que 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 7: Avaliação e aprovação da precisão inter-corrída.

PRECISÃO INTER-CORRIDA			
Dia 1- intra-corrída		Dia 2 - inter-corrída	
Amostras	[] µg/ml	Amostras	[] µg/ml
A1	10,45	A1	10,24
A2	10,82	A2	10,26
A3	10,63	A3	10,14
A4	10,94	A4	10,12
A5	10,86	A5	10,35
A6	10,67	A6	10,30
A7	10,99	A7	10,29
A8	10,69	A8	10,28
A9	10,65	A9	10,29
[] µg/ml	10,50 ±0,35	DPR 3,4%	

5.4.6 - Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pela recuperação de óxido de etileno nas concentrações de 80, 100 e 120% da concentração de trabalho para 100,4, 101,2 e 99,6 dentro do critério aceitação: 98,0 a 102,0% Tabela 8 (BRASIL, 2003).

Tabela 8: Resultados de exatidão nos diversos níveis de concentração de óxido de etileno avaliados

ENSAIO DE EXATIDÃO %; µg/ml					
Teórica 80%	Obtida	Teórica 100%	Obtida	Teórica 120%	Obtida
(8 µg/ml)	7,9964	(10 µg/ml)	10,0241	(12 µg/ml)	11,1413
(8 µg/ml)	8,0785	(10 µg/ml)	10,2324	(12 µg/ml)	11,7226
(8 µg/ml)	8,0692	(10 µg/ml)	10,1537	(12 µg/ml)	12,0767
Média ± DP	8,0480 ± 0,045	Média ± DP	10,1367 ± 0,105	Média ± DP	11,9802 ± 0,472
DPR%	0,6	DPR%	1,0	DPR%	1,9
Vd	8,0480	Vd	10,1367	Vd	11,9802
Vt	8,0160	Vt	10,0200	Vt	12,0240
E%	100,4	E%	101,2	E%	99,6
EXATIDÃO			100,4 % ±0,8		

5.4.7 - Limite de detecção e quantificação

O menor nível detectado foi 0,3 µg/ml, o ruído 0,1 µg/ml foi obtido na área obtida de 0,9599 mv*s. O limite de quantificação foi 1,0 µg/ml, nesta concentração o método apresentou linearidade, precisão e exatidão aceitáveis nos valores mínimos de 80 a 120% da concentração de trabalho (BRASIL, 2003).

5.4.8 - Intervalo

O método apresentou linearidade satisfatória para a faixa de 80 a 120% da concentração de trabalho, precisão e exatidão adequados para esta faixa, o intervalo de trabalho em que se tem uma verificação segura da determinação da concentração de Óxido de Etileno encontra-se na faixa de 80 a 120% da concentração de trabalho (BRASIL, 2003).

5.4.9 - Robustez

As alterações deliberadas nos parâmetros cromatográficos proporcionaram resultados dentro do critério de aceitação DPR% <5 para as 8 metodologias propostas (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8), ensaiadas em triplicata para o EtO na concentração do padrão de trabalho EtO 10 µg/ml, demonstrando boa separação e simetria dos picos conforme Tabela 9.

Tabela 9. Combinação ensaiada por conveniência para determinar a concentração do padrão de trabalho nas metodologias: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8.

Fator	Robustez – Novas Metodologias (R1 to R8)							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
A/a	A	A	A	a	A	A	A	a
B/b	B	b	B	B	B	b	B	b
C/c	C	c	C	c	c	C	C	C
D/d	D	D	D	D	D	d	D	d
E/e	E	e	E	E	E	E	e	E
F/f	F	F	f	f	f	f	F	F
G/g	G	G	G	g	G	G	g	g
[]EO µg/ml	10,0±0,7	10,0±0,9	9,94±1	9,97±0,6	10,02±0,9	10,04±1,1	9,93±1,2	9,99±0,8
DPR <5,0%								

5.4.10- Determinação do tempo de aeração e resultado das análises cromatográficas

Análise dos cromatogramas das amostras avaliados nos tempos: 0, 4, 6, 12, 24 e 48h conforme Tabela 10.

Tabela 10: Resultados das análises cromatográficas dos frascos enterais aerados nos tempos 0, 4, 6, 12, 24 e 48 horas para o limite residual de 10 µg/ml.

Ciclo	Tempos de Aeração VS Concentração EtO					
	0 h	4 h	*6 h	12 h	24 h	48 h
534	14±1µg/ml	11±1 µg/ml	8±1 µg/ml	4,7±0,5 µg/ml	2,3±0,5 µg/ml	1±0 µg/ml
535	14±1µg/ml	12,0±1 µg/ml	8,0±1 µg/ml	5,0±1 µg/ml	2,7±1,1 µg/ml	1±0 µg/ml
536	13,3±0,5µg/ml	10,6±0,5 µg/ml	7,3±1,1 µg/ml	3,6±1,1 µg/ml	1,7±0,5 µg/ml	1±0 µg/ml
Limite Residual de EtO 10 µg/ml						

5.4.11 - Aprovação residual a partir do tempo de 6 horas

A avaliação do processo de aeração demonstrou que quanto maior o tempo de aeração, maior será a redução residual. Considerada significativa ($p < 0,05$) para todos os tempos avaliados pelo Teste (*Turkey-Kramer*), Programa *GRAPHPAD INSTAT 3.0*, o que aprovou a reprodutibilidade para os ciclos 534, 535 e 536 conforme Figura 10.

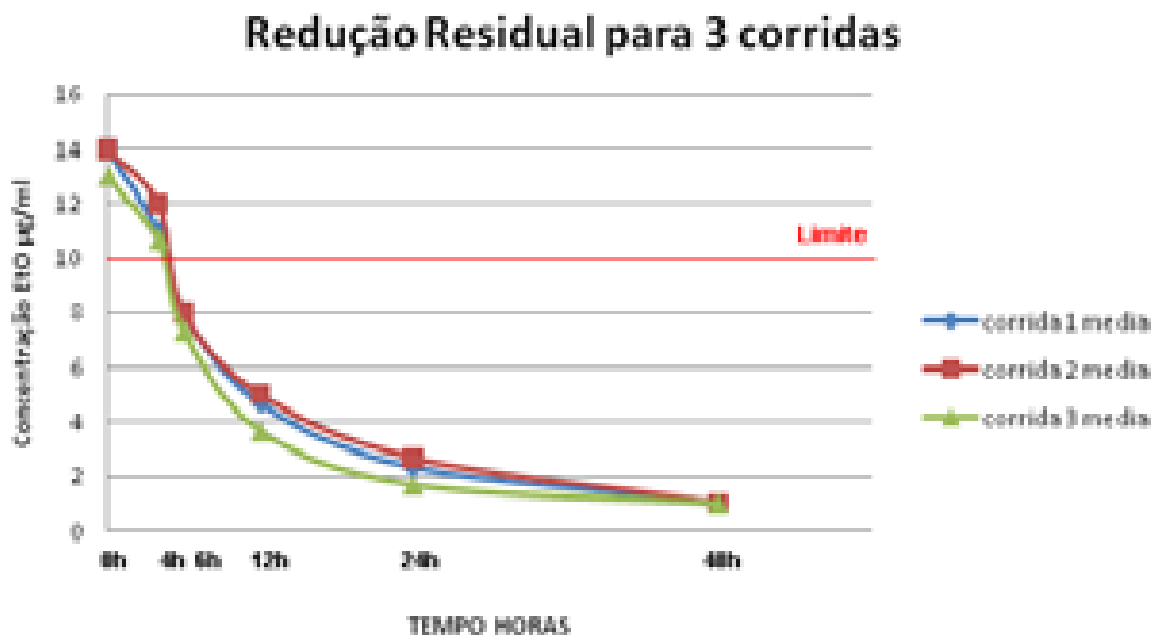


Figura 10: Regressão residual significativa para todos os tempos analisados * $P < 0,05$.

A concentração residual das amostras analisadas para o limite de $10 \mu\text{g/ml}$ demonstrou significativa redução residual ($p < 0,05$) a partir do tempo de 6 horas de aeração quando comparado aos tempos 0 e 4 horas através do Teste (*Shapiro-Wilk*), Programa *BIOSTAT 4.0* conforme Figura 11.

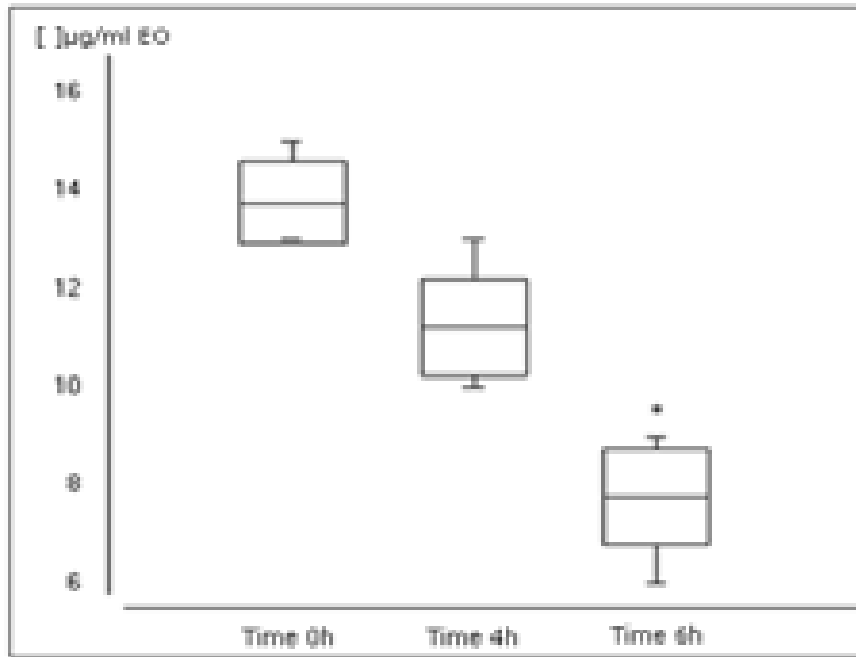


Figura 11. A partir do tempo de aeração 6 horas a concentração residual nos frascos ficaram abaixo do limite 10 µg/ml, sendo o tempo mais próximo ao resultado do Bioindicador Rápido de 4 horas, * $p < 0,05$.

6 - DISCUSSÃO

Reutilizar ou não reutilizar um produto médico-hospitalar fabricado para uso único tem sido um questionamento mundial (SILVA e PINTO, 2005). Vários estudos realizaram comparativos da eficiência, riscos e custo - benefício do óxido de etileno em relação a outros métodos de esterilização a baixa temperatura como plasma peróxido de hidrogênio, formaldeído e ácido peracético, concluindo que não houve evidências de que algum desses métodos pudesse ser melhor que o óxido de etileno (ALFA *et al.*, 1996; RUTALA, GERGEN e WEBER, 1998; GOUVEIA *et al.*, 2009; BATISTA *et al.*, 2010)

Existe um consenso que produtos médicos ou farmacêuticos utilizados em procedimentos cirúrgicos devem ser totalmente livres de microrganismos e que são necessários maiores estudos sobre a reutilização segura de produtos considerados inicialmente de uso único, principalmente em relação à limpeza de resíduos orgânicos, resistência dos materiais e maiores estudos clínicos (BATHINA *et al.*, 1998).

Estudos realizados por Brown *et al.*, (2002) demonstraram limitações relacionadas à reutilização em materiais utilizados para a fabricação de produtos médico-hospitalares como o látex, silicone, poliuretano, *nylon* e o polietileno em relação a força tênsil reduzida, afetando a segurança.

A esterilização por óxido de etileno constitui um importante papel no controle de infecções, seja para a reutilização segura ou em produtos de uso único. A validação do processo permitiu introduzir a esterilidade nos frascos enterais, obtendo-se excelentes resultados referente aos parâmetros físicos, ensaios de endotoxina, testes de esterilidade e aplicação do bioindicador rápido com esporos de *Bacillus atropheaus*. A eficácia da esterilização por óxido de etileno (EtO) para artigos médicos foi confirmada em vários estudos (MUSA, 2002; CAMPOCCIA *et al.*, 2006).

Estudo realizado para verificar a eficiência do óxido de etileno em furadeiras intencionalmente contaminadas com esporo de *Bacillus atropheaus* obteve 99,99% de eficácia do método utilizado (GOUVEIA *et al.*, 2009). Em outro experimento utilizando o EtO como método de esterilização para equipamentos termossensíveis e elétricos, também foi considerado satisfatório (D´LIA *et al.*, 2007).

A metodologia e os parâmetros cromatográficos utilizados por Nagaroto e Vessoni (2006) foram essenciais para a validação do método analítico (GCFID) aprovado em todos os parâmetros analisados (BRASIL, 2003).

Esta metodologia permitiu quantificar o óxido de etileno residual em frascos enterais, determinando que a partir de 6h de aeração os produtos podem ser liberados para comercialização e uso em níveis seguros de 10 ppm (USP 30, 2007). Porém, no Brasil a Portaria 482 de 1999 da ANVISA, determina que para produtos médico-hospitalares que contatam o sangue o limite residual é de 25 ppm.

Por outro lado alguns estudos analisados por Cardoso (2003) verificou-se que o uso de dialisadores virgens esterilizados por óxido de etileno levou a ocorrência de manifestações indesejáveis em alguns pacientes, como a ocorrência de dispnéia, broncoespasmo, urticária, náuseas, vômitos, câimbras, hipotensão e cefaléia em especial quando empregado na fabricação resina que tem capacidade de retenção do óxido de etileno confirmando assim, a necessidade de reduzir os níveis de óxido de etileno residual para níveis cada vez menores como o que foi realizado neste estudo.

O tempo de 6h para aeração em 10 ppm representa ganho de tempo e segurança quando comparado ao estudo realizado por *Martins et al.* (2003) que determinou os níveis de *EtO* em cânulas de perfusão e obteve o tempo de 19h de aeração no limite de 25 ppm.

O tempo para que cada material fosse aerado foi apresentado por Tock e Chen (1974) e pode ser adaptado para cada situação, o que pode confirmar as diferenças para o frasco enteral e as cânulas de perfusão. Esta diferença de tempo pode ser justificada pela temperatura de 55°C utilizada neste estudo em relação a temperatura de 35°C utilizada no estudo das cânulas (*MATTHEWS et al.*, 1989).

Além disso, neste estudo foi utilizada a remoção mecânica dentro da autoclave através de 14 pulsos ar/vácuo (pré-aeração) conforme estudo realizado (THOMAS e LONGMORE, 1971). Estes pulsos fizeram que a concentração de *EtO* inicial fosse reduzida na autoclave, aumentando a eficiência do processo da sala de aeração (VINK e PLEIJSIER, 1986). Outro fator de ganho de tempo pode ser justificado pela configuração do artigo (POSSARI, 2003), baixo peso, grande volume e ausência de resistência a aeração como válvulas, conexões de PVC, aço, alumínio ou borrachas que podem estar presentes nas cânulas de perfusão.

Os principais riscos da utilização do óxido de etileno em materiais médico-hospitalares foram estudados por Marin e Gallén, (1987) que enfatizam medidas preventivas e de proteção para o controle de risco ocupacional. Estudos realizados em trabalhadores expostos ao EtO, demonstraram maior incidência de câncer de estômago, câncer de pulmão, leucemia, fototoxicidade, propriedades teratogênicas e irritantes do óxido de etileno (THIESS *et al.*, 1981; MORGAN *et al.*, 1981). Estes estudos ressaltam a toxicidade do *EtO* tanto para trabalhadores como para usuários dos produtos esterilizados confirmando a necessidade de validação da esterilização e principalmente a comprovação de segurança residual.

A validação do processo de esterilização através da qualificação física, microbiológica e química residual. Incluindo a validação do método analítico (*GCFID*) confirmou a eficiência e reprodutibilidade dos parâmetros utilizados para determinar o tempo de aeração em frascos enterais conforme *ISO 10993-7* (2001), *ISO 11135* (2007), ANVISA Portaria 482 (BRASIL, 1999), ANVISA RE 899 (BRASIL, 2003) e *USP 30* (2007).

Embora o resultado do bioindicador rápido proporcione a aprovação do ciclo de esterilização em 4 horas, o produto somente poderá ser liberado a partir de 6 horas de aeração em limites residuais seguros, o que proporcionou ganho de produtividade quando comparado ao tempo anterior de 48 horas do bioindicador convencional 1264.

7 - CONCLUSÃO

Todas as etapas de validação para esterilização de frascos enterais por óxido de etileno foram alcançadas para as qualificações física, microbiológica e química.

As qualificações físicas e microbiológicas comprovaram a eficiência do bioindicador rápido através de sensores físicos, integrador químico, testes de esterilidade e endotoxina.

A qualificação química através das análises por cromatografia a gás permitiu determinar o tempo mínimo de 6 h de aeração residual para frascos enterais nos níveis seguros de 10 ppm ao invés de 25 ppm preconizados pela Portaria 482 da ANVISA (BRASIL, 1999).

A redução do tempo de aeração de 48 h para 6h deverá proporcionar maior rapidez, segurança e economia no processo de esterilização por óxido de etileno em produtos farmacêuticos e médico-hospitalares.

Antes de estender esta metodologia a outros produtos que não sejam os frascos enterais estéreis, deverá haver pelo menos co-validação dependendo do tipo de material do produto e exigências legais de qualidade.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. Esterilizadores a gás de óxido de etileno. NBR 13849, Rio de Janeiro, p. 1-7, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. Esclarecimento sobre a aplicação da RE 899/03 na Validação de Métodos Analíticos, Rio de Janeiro-RJ, p. 1-6, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. Esterilização de produtos para a saúde – Indicadores biológicos Parte II Indicadores biológicos para esterilização por Óxido de Etileno. NBR 11138-2, Rio de Janeiro - RJ, p. 1-5, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. Esterilização de produtos para saúde – indicadores biológicos. Parte 2: Indicadores biológicos para esterilização por óxido de etileno. NBR 11138-2, Rio de Janeiro - RJ, p. 1-6, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. NBR 12946. Papel grau cirúrgico para fabricação de embalagens de artigos odonto-médico-hospitalares a serem esterilizados por vapor saturado sob pressão ou por radiação. Rio de Janeiro -RJ, p. 1-5, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. Produtos para saúde: Validação e controle de rotina da esterilização por óxido de etileno. NBR 15245, Rio de Janeiro – RJ, p. 1-8, 2005.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. Biological evaluation of medical devices - Part 7: Ethylene oxide sterilization residual: ISO 10993-7, Arlington, p. 1-10, 2001.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. Medical devices - *Validation and routine control of ethylene oxide sterilization*: ISO 11135, Arlington, 2007.

AZEVEDO, J. C., CRUZ, A. S., PINTO T. J. A. Rev. Bras. Cienc. Farm. v.42, São Paulo, 2006.

BATHINA MN, MICKELSEN S, BROOKS C, JARAMILLO J, HEPTON T, KUSUMOTO FM. *Safety and Efficacy of Hydrogen Peroxide Plasma Sterilization for Repeated Use of Electrophysiology Catheters.* J. Am. Coll. Cardiol, p. 8-1384, 1998.

BATISTA, N. S., GRAZIANO, K. U., PADOVEZE, M.C, KAWAGOE, J. Y. *The sterilization efficacy of reprocessed single use diathermy pencils.* Rev. Lat. Am. Enferm, p. 6-81, 2010.

BERTANI, N. G, OLIVEIRA, T. A, ALVERNAZ, S. S. Artigo de Revisão: *Análise qualitativa entre os métodos químicos e físicos de esterilização*. Rev. Edu. Meio Amb. e Saúde, p. 223-237, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Interministerial nº 482: Dispõe sobre o uso e instalação do óxido de etileno, Brasília, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 216. Regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 210: Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações Gerais para Central de Esterilização. Brasília, 2001.

BROWN SA, MERRITT K, WOODS TO, MCNAMEE SG, HITCHINS VM. *Effects of Different Disinfection and Sterilization Methods on Tensile Strength of Materials Use for Single-Use Devices*. Biomed. Instrum. Technol, p. 7-23, 2002.

CAMPOCCIA, D, MAONTANARA, L, ARCIOLA, C. R. *The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance*. Rev. Biomaterials, p. 2331-2339, 2006

CARDOSO, R. C. *Avaliação ambiental de hospitais sob o enfoque de produção mais limpa*: Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

COOPER, J.F.; JORDAN, F.T. Starting a kinetic LAL system. *LAL Times*, v. 7, p.1-5, 2000.

COTTON, R. T, ROARK, R. C. *Ethelene oxide as a fumigant*. Ind. Eng. Chem. Washington, p. 9-805, 1928.

D'LIA, C. O. SANTOS, A.L.G. LEONHARDT, M. C.: ET AL. *Tratamento das infecções pós artroplastia total de joelho: resultados com 2 anos de seguimento*. Acta. Ortop. Bras, p.158-162, 2007.

DEMARZO, D. E, SILVA, A. *Esterilização por óxido de etileno: a utilização de serviços terceirizados*. SOBECC, p. 6-11, 1997.

FERRAZ, C. A. M. *Teste de esterilidade em artigos médico-hospitalares: requisitos técnicos e interpretação de resultados*. Ver. Efoque, v. 16, p. 4-90, 1988.

GOVEIA, V. R., PINHEIRO, S. M. C., GRAZIANO, K. U. *Métodos de esterilização por baixa-temperatura e novas tecnologias*. Rev. Lat. Am. Enferm, v. 15, 2007.

GOVEIA, V. R., PINTO, F. M. G., MACHOSHVILI, I. A., PENNA, T. C. V., GRAZIANO, K. U. *Evaluation of the sterilization efficacy of domestic electric drills*, Braz. Journ. Of Microb, v. 40, p. 541-546, 2009.

GRAHAM, G.S. Decontamination: scientific principles. In: Reichert M, Young JH. Sterilization technology. 2nd Ed. Maryland: Na. Aspen Publication, p. 1-9, 1997

3M do Brasil LTDA., *Manual de utilização do ATTEST 1296*, Indicador biológico rápido, São Paulo, 2008.

GRAZIANO, K.U. *et al.*, Limpeza, desinfecção, esterilização e anti-sepsia. In: Fernandes A. T. Infecção hospitalar e sua interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu, 2000.

HERANCE, G. *et al.*, Esterilización com oxide de etileno: Repercusiones em El âmbito hospitalario. Rev. Enferm, v. 13, p. 19-22, 1990.

LONGHI, L.F. Manual de esterilização por óxido de etileno. São Paulo, 1994.

MARIN, A.P, GALLEN, P.S. *Aspectos toxicológicos de la exposición al óxido de etileno*. Rev. de Saúde Pública, 1987.

MARTINS, A. M. S., *et al.* *Determinação dos níveis de óxido de etileno, etilenocloridrina e etilenoglicol em cânulas de perfusão após processo de esterilização*. Rev. Lat. Am. de Technol. Extracorp, 2003.

MATTHEUS, I.P, GIBSON, C, SAMUEL A.H. *Enhancement of the kinetics of the aeration of ethylene oxide sterilized polymers using microwave radiation*. Journ. Biomed. Mater. Res, p. 23-143, 1989.

MORGAN, R. W., *et al.* Rev. J. occup. Med, v. 23, p. 70-767, 1981.

MUSA, A. A. *How to adapt na ordinay drilling machine for orthopaedic surgery*. West Afr. J. Med, p. 21-59, 2002.

NAGAROTO, S. L. P, VESSONI, T. C. *Desinfecção e Esterilização*. São Paulo, 2006.

NOGUEIRA, M. H. N., *et al.* *Estudo do nível impregnação do ar ambiental pelo óxido de etileno*, Enfoque, v. 12, p. 5-32, 1984.

NOGUEIRA, M. H. N. *et al.* *Resíduos tóxicos em cânulas e seringás esterilizadas com óxido de etileno*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 49, p. 27-34, 1989.

OHASHI, Y.; MAMIYA, T.; MITANI, K.; WANG, B.; TAKIGAWA, T.; KIRA, S.; KATAOKA, H.; Anal. Chim. Acta, p. 167-566, 2006.

OKUMA, T., NAKAMURA, M, TOTAKE, H, FUKUNAGA, Y. *Microbial contamination of enteral feeding formulas and diarrhea*. Rev. Nutrition, v. 16, p. 22-719, 2000.

OLIVEIRA, G. P. C., WAITZBERG, D. L.. *Contaminação microbiológica em nutrição enteral*. In: Waitzberg D. L. Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3ªed. São Paulo, p. 649, 2001.

OLIVEIRA, M. R, BATISTA, C. R, AIDOO, K. E. *Application of hazard analysis critical control points system to enteral tube feeding in hospital*. Journ. Hum. Nutr. Diet, v. 14, p. 397-403, 2001.

PADOVEZE, M. C. *Aspectos Gerais: esterilização de artigos em unidades de saúde*. APECIH, p. 2-18, 2003.

PENG, G. W, CHIOU, W. L. *Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies*. Journ. of Chromatography, v. 531, p. 3-50, 1990.

PEREIRA, A. S., NETO, F. R. A. *Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura*, Rev. Quím. Nova, p. 23, 2000.

PINTO, T. J. A., SAITO, T. *Esterilização por óxido de etileno. II Influência de corpos de prova no desempenho de monitores biológicos e sua avaliação*. Rev. Saude. Pub. São Paulo, v. 26, 1992

PINTO, T. J. A., SILVA, M. V. *Reutilização simulada de produtos médico-hospitalares de uso único, submetidos à esterilização com óxido de etileno*. Rev. Bras. de Ciênc. Farm. Braz. Journ. of Pharmac. Sciences, v. 41, 2005.

POSSARI, J. F. *Esterilização por óxido de etileno*. Ed. Atria, Rio de Janeiro, 2003.

RIBANI, M., *et al*. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Quim. Nova, v. 27, p. 771 – 781, 2004.

RIBEIRO, N. F. *Análise de perigos e pontos críticos de controle na unidade de alimentação e nutrição (UAN)*. In: FERNANDES, A. T. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo, v.2, p. 55-1247, 2000.

RUTALA, W. A, GERGEN, M. F, WEBER, D. J. *Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, plasma sterilization systems an liquid peracetic acid*. Am. Journ. Infect. Control, p. 8-393, 1998

RUTALA, W. A. *Desinfection sterilization, and waste disposal*. In: WENZEL, R. P. *Prevention and control of nosocomial infections*. 3ª ed. BALTIMORE: Willians & Wilkins; 1997.

SILVA, M. V., PINTO, T. J. A: *Reutilização simulada de produtos médico-hospitalares de uso único, submetidos à esterilização com óxido de etileno*. Braz. Journ. of Pharm. Scienc, vol. 41, 2005.

SILVA, R. J. M. C. L, FARIAS, T. A. L, FILHO, L. F, OLIVEIRA, E. J. A. *Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de ampicilina em injetáveis utilizados em hospitais públicos de Recife, Brasil.* Rev. Lat. Am. Journ. Pharm, p. 72-8, 2010.

SIMON, M. I. S. S, FREIMÜLLER, S, TONDO, E. C, RIBEIRO, A. S, DREHMER, M. *Microbiological quality and temperatures of enteral feedings before and after implementation of hazard analysis and critical control point,* Rev. Nutr., Campinas, , v. 20, p. 139-148, 2007.

THIESS, A. M, *et al.* In: *Internal Symposiun on Prevention of Occupational Cancer, Proceedings.* Helsinki, Finland, p. 59-249, 1981.

THOMAS, L. C, LONGMORE, D. B. *Ethelene oxide sterilization of surgical stores.* Rev. Anaesthesia, p. 26-143, 1971.

TOCK, R. M, CHEN Y.C. *Aeration if medical plastic,* Journ. Biomed. Mater. Res, v. 8, p. 69-80, 1974

The United States Pharmacopeia – USP, 30.Ed. Rockville, United States Pharmacopeia Convention, Easton: Mark, cap. 467, 2007.

VINK, P, PLEIJSIER K. *Aeration of ethylene oxide sterilized polymers.* Rev. Biomaterials, p. 7-225, 1986.

ZANON, U. *Esterilização.* In: ZANON, U, NEVES, J. *Infecções Hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento.* Rio de Janeiro, 1987.

9 - APÊNDICES

9.1 - APÊNDICE I

SISTEMAS DE UTILIDADES VERIFICADOS PELA MANUTENÇÃO	
<input type="checkbox"/> Capacitor de Fase <input type="checkbox"/> Capacitor de Partida <input type="checkbox"/> Funcionamento do compressor <input type="checkbox"/> Limpeza da casa de máquinas <input type="checkbox"/> Limpeza do condensador <input type="checkbox"/> Limpeza da serpentina <input type="checkbox"/> Hélice do motor <input type="checkbox"/> Painel elétrico <input type="checkbox"/> Limpeza da bandeja e dreno <input type="checkbox"/> Limpeza das grelhas e difusores <input type="checkbox"/> Limpeza dos filtros de ar <input type="checkbox"/> Limpeza externa do equipamento <input type="checkbox"/> Limpeza interna do equipamento <input type="checkbox"/> Isolamento do compressor <input type="checkbox"/> Isolamento do evaporador <input type="checkbox"/> Isolamento do condensador <input type="checkbox"/> Óleo do compressor <input type="checkbox"/> Nível do óleo lubrificante	<input type="checkbox"/> Aperto dos terminais elétricos <input type="checkbox"/> Sub-resfriamento <input type="checkbox"/> Superaquecimento <input type="checkbox"/> Vazamento de gás <input type="checkbox"/> Filtros de gás <input type="checkbox"/> Focos de ferrugem <input type="checkbox"/> Vibração anormal <input type="checkbox"/> Resistência do Carter <input type="checkbox"/> Lubrificação dos mancais <input type="checkbox"/> Disjuntores <input type="checkbox"/> Chave geral <input type="checkbox"/> Alinhamento das polias <input type="checkbox"/> Correias <input type="checkbox"/> Válvulas de serviço <input type="checkbox"/> Funcionamento da(s) válvula(s) <input type="checkbox"/> Funcionamento do termostato <input type="checkbox"/> Isolamento termoacústico <input type="checkbox"/> Rolamento(s) da(s) Turbina(s)
Resultado para Manutenção	Aprovada

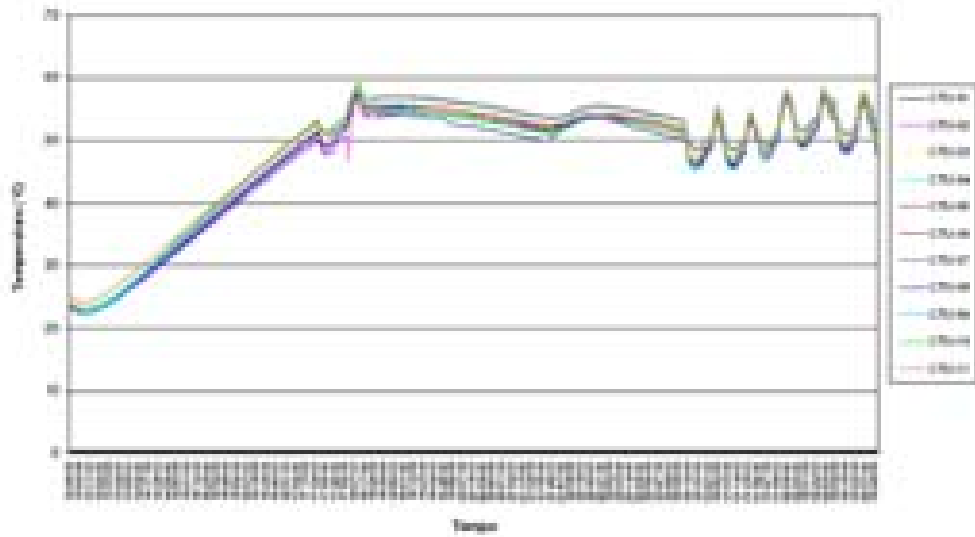
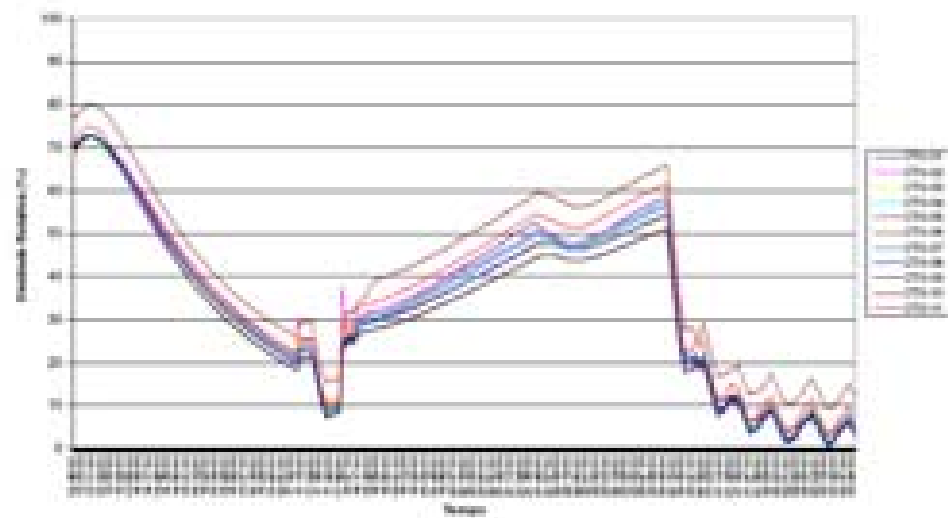
9.2 - APÊNDICE II

CALIBRAÇÃO DOS INSTRUMENTOS	
Item	STATUS
Malha de temperatura (PME-EST-SES-AUT03-STE01)	Calibrado
Malha de temperatura (PME-EST-SES-AUT03-STE02)	Calibrado
Malha de temperatura (PME-EST-SES-AUT03-STE04)	Calibrado
Malha de temperatura (PME-EST-SES-AUT03-STE04)	Calibrado
Malha de umidade (PME-EST-SES-AUT03-SUM1)	Calibrado
Manovacuômetro (PME-EST-SES-AUT03-MVC01)	Calibrado
Válvula de segurança. (PME-EST-SES-AUT03-VSE01)	Calibrado
Indicador de pressão (PME-EST-SES-AUT03-MAN01)	Calibrado
Indicador de pressão (PME-EST-SES-AUT03-MAN02)	Calibrado
Indicador de pressão (PME-EST-UTI-AUT03-MAN01)	Calibrado
Indicador de pressão (PME-EST-UTI-AUT03-MAN02)	Calibrado

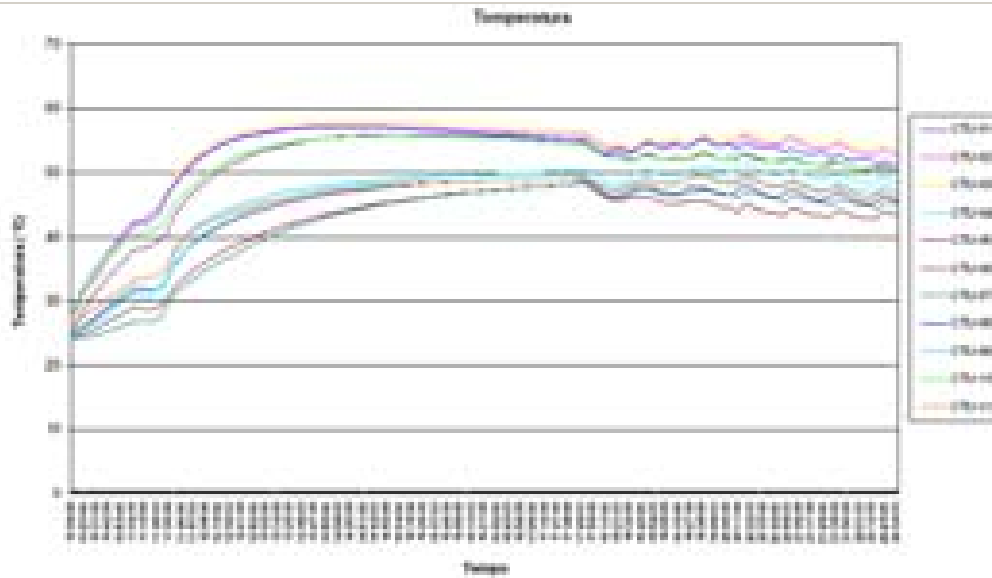
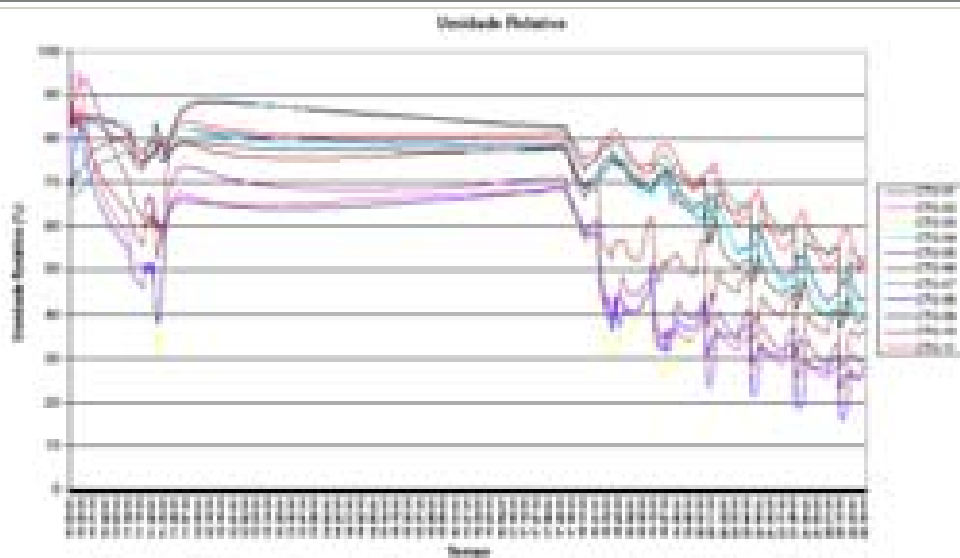
9.3 - APÊNDICE III

VERIFICAÇÃO DE DOCUMENTAÇÃO DA AUTOCLAVE		
Item	Critério de Aceitação	Resultado
Manual de Operação	Descrito	Aprovado
Manual de Manutenção Preventiva	Descrito	Aprovado
Lista de Peças Sobressalentes	Descrito	Aprovado
Especificação Técnica	Descrito	Aprovado
Livro de registro	Descrito	Aprovado
Layout Construtivo	Descrito	Aprovado
Layout Hidráulico	Descrito	Aprovado
Layout Elétrico	Descrito	Aprovado
Layout tubulação gás	Descrito	Aprovado
Diagrama do Comando	Descrito	Aprovado
Fluxograma do Processo	Descrito	Aprovado
Requerimento do usuário	Descrito	Aprovado
Procedimento operacional	Descrito	Aprovado
Procedimento de segurança	Descrito	Aprovado
Procedimento de emergência	Descrito	Aprovado
Procedimento do Scrubber	Descrito	Aprovado

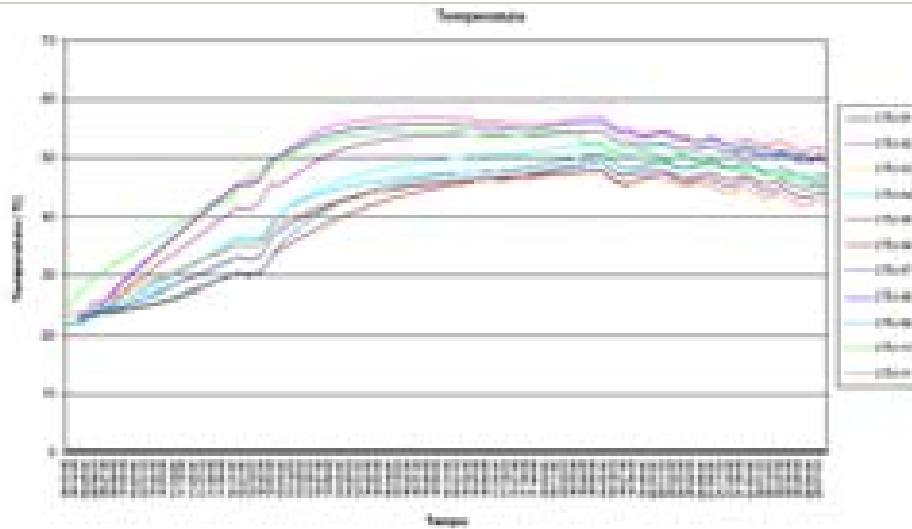
9.4 - APÊNDICE IV

GRÁFICOS DA QUALIFICAÇÃO FÍSICA – AUTOCLAVE VAZIA**Gráfico de temperatura: ciclo 533****Gráfico de umidade relativa: ciclo 533**

9.6 - APÊNDICE VI

**GRÁFICOS DA QUALIFICAÇÃO FÍSICA – Corrida 2
AUTOCLAVE CARREGADA – 90% (Frasco Enteral): 80 caixas****Gráfico de temperatura: ciclo 535****Gráfico de umidade relativa: ciclo 535**

9.7 - APÊNDICE VII

**GRÁFICOS DA QUALIFICAÇÃO FÍSICA – Corrida 3
AUTOCLAVE CARREGADA – 90% (Frasco Enteral): 80 caixas****Gráfico de temperatura: ciclo 536****Gráfico de umidade relativa: ciclo 536**