

ESTUDO PARA FIXAR VALOR DE D EM ESTERILIZAÇÃO POR AUTOCLAVE

SALMAZO NETTO, Fernando Lima, SOUZA, Andréa Cristiane de

fersalmazo@gmail.com

Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz

Resumo: A esterilização por calor úmido, através do equipamento chamado autoclave, é a maneira mais rápida, eficaz, segura e econômica encontrada hoje para assegurar a total eliminação da vida microbiológica dos materiais que sofrem a autoclavação. O calor úmido destrói os microorganismos por coagulação e desnaturação irreversíveis de suas enzimas e proteínas estruturais. A esterilização é muito utilizada nas indústrias farmacêuticas para a produção de produtos estéreis, e para isso é utilizado um bioindicador com *Geobacillus stearothermophilus*, pois apresentam uma maior resistência ao calor. Os indicadores biológicos possuem o chamado valor D que serve para definir o tempo para reduzir em um log a concentração da carga microbiana inicial, e com isso podemos determinar o tempo mínimo de esterilização que os produtos devem sofrer. Na tentativa de fixar um valor único para o valor D foi verificada a complexidade, devido a existência de variáveis que impede essa fixação do valor D, entretanto existem artigos e farmacopeias que determinam um tempo mínimo de esterilização para determinados materiais.

Palavras chave: Autoclave, esterilização, calor úmido, Valor D

Abstract: The moist heat sterilization by autoclave equipment called, is the most rapid, efficient, safe and economical found today to ensure complete elimination of microbial life to materials that undergo autoclaving. Moist heat destroys microorganisms by coagulation and irreversible denaturation of their enzymes and structural proteins. Sterilization is widely used in the pharmaceutical industries for production of sterile products and to do so with a bioindicator is used *Geobacillus stearothermophilus* because they present a greater heat resistance. Biological indicators have called the D value used to set the time on a log to reduce the concentration of the initial microbial load, and with this we can determine the minimum sterilization that products must suffer. In an attempt to establish a single value for the D value was observed complexity, and because there are variables which prevents the determination of the value D, however there are articles and pharmacopoeias that determine a minimum time of sterilization for certain materials.

Keywords: Autoclave sterilization, moist heat, D Value

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o conceito de esterilidade refere-se à total ausência de formas viáveis capazes de reprodução. (PINTO et al., 2010). A esterilidade ou nível de segurança pode ser definido como a incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização durante a conservação e utilização dos produtos.

As inativações de microrganismos por meios físicos ou químicos seguem uma lei exponencial e, portanto, há uma probabilidade estatística de que microrganismos possam sobreviver ao processo de esterilização (RDC 17/2010).

A manutenção do nível de esterilidade conferido a um produto garante o prolongamento da sua vida útil. Para monitorar os ciclos de esterilização, são utilizados esporos de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 na forma de bioindicador, cuja função é estabelecer, avaliar e monitorar os parâmetros físicos do ciclo de esterilização para o equipamento definido. Os esporos de *Bacillus stearothermophilus*, por apresentarem maior termoresistência, podem ser empregados como indicadores biológicos nos processos de esterilização pelo vapor úmido, particularmente na temperatura de 121°C (LETRARI, et al., 2006).

O calor não é somente o agente esterilizante mais usado como também o mais econômico e mais fácil de controlar. O calor úmido quando comparado ao calor seco é um processo efetivo em função do uso de temperaturas mais baixas e, do curto período de tempo necessário para garantir o nível de esterilidade proposto (LETRARI, et al., 2006).

Indicador biológico consiste em um preparado de um microrganismo específico resistente a um determinado processo de esterilização, quando usado na forma adequada quantifica satisfatoriamente a eficiência do processo de esterilização pela integração dos fatores letais de tempo e de temperatura, sobre a população microbiana. Por ser a esterilização através do calor úmido a que apresenta melhores resultados em destruição microbiana, se faz necessário conhecer e definir os parâmetros básicos de cinética de morte microbiana, valor de D e valor de Z (LETRARI, et al., 2006).

O valor D, tempo de redução decimal, é o tempo em minutos necessário para reduzir a população microbiana em 90% ou um ciclo logaritmo, a uma condição específica, isto é, para uma fração sobrevivente de 1/10 (RDC 17/2010).

A partir do valor de D de um lote de bioindicadores é possível determinar o tempo mínimo que um microrganismo deve ser exposto ao agente esterilizante.

Um grande problema enfrentado hoje nos processos de esterilização é a grande variável do Valor de D, que faz com que os tempos de esterilização mudem a cada processo.

2 AUTOCLAVE

Os esterilizadores modernos são, de fato, mais que um vaso de pressão com controle discreto o que os coloca na modalidade de máquina de média complexidade, demandando profissionais cada vez mais capacitados em sua operação e manutenção.

A figura 1 mostra o diagrama básico de um esterilizador a vapor horizontal de dupla porta e seus principais componentes.

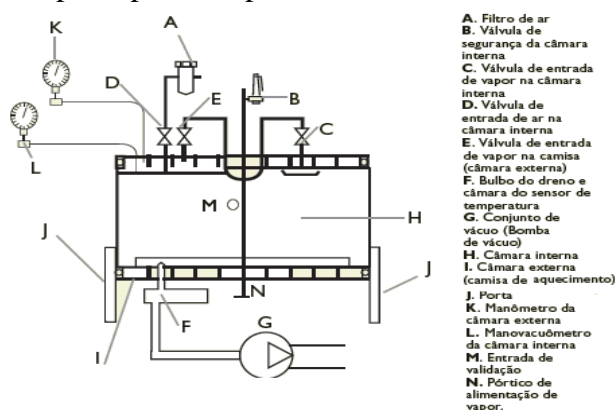


Figura 1 Autoclave

Fonte: LUQUETA,2008

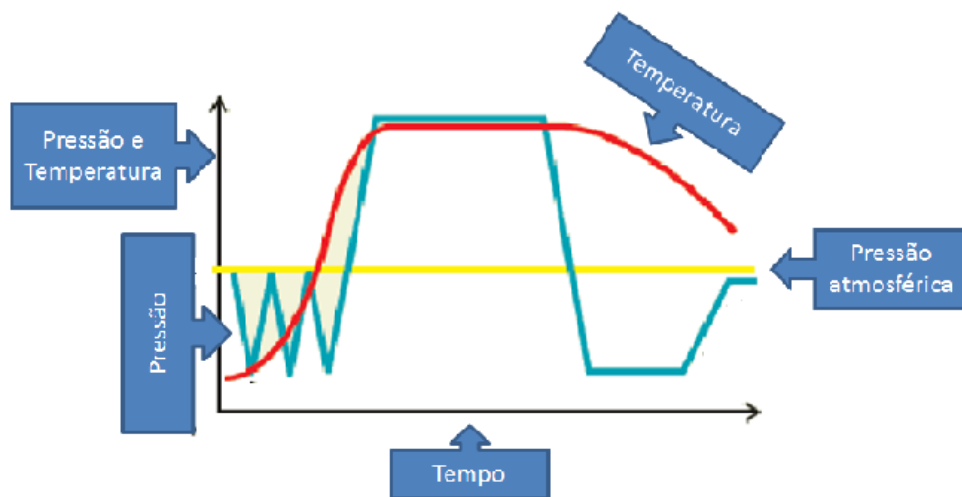


Figura 2 Relação Tempo/ Pressão e Temperatura
 Fonte: LUQUETA,2008

O funcionamento básico do esterilizador vai depender do perfil de ciclo programado.

O perfil mais comum nas autoclaves a vácuo é aquele utilizado para a esterilização de materiais sólidos, tais como metais, vidrarias, vestimentas, etc.

O ciclo de materiais sólidos não é indicado, contudo, para produtos envasados em frascos herméticos ou não, líquidos em geral, meios de cultura e em ciclos de descarte de materiais altamente contaminados. Para estes produtos existem perfis de ciclo específicos que demandam alterações sutis no diagrama da figura 1.

O perfil de temperatura e pressão no tempo para a esterilização de materiais sólidos é basicamente o demonstrado na figura 2

Ao ligarmos o esterilizador no perfil de ciclo para sólidos e estando o suprimento de vapor presente na entrada **N**, a válvula **E** abrirá, deixando entrar vapor na camisa. A pressão de vapor da câmara externa será indicada pelo manômetro **K**. A principal função da camisa (ou câmara externa) é promover o aquecimento das paredes internas da câmara, evitando a formação de condensado durante a injeção de vapor na câmara interna. A câmara externa aquecida também auxilia na fase de secagem, irradiando calor no material a ser processado.

Uma vez fechadas as portas (**J**), pode-se iniciar o processo de esterilização. O primeiro passo é o chamado pré-vácuo, que consiste na remoção do ar no interior da câmara através de pulsos alternados de vácuo e injeção de vapor.

A fase de pulsos de vácuo, além de remover o ar presente no sistema, também tem por finalidade fornecer energia térmica aos materiais a serem submetidos ao vapor esterilizante antes da injeção definitiva deste, diminuindo a condensação na transferência de energia e, conseqüentemente, facilitando a secagem final.

A fase seguinte ao pré-vácuo é chamada de rampa de aquecimento, onde o vapor é injetado pela válvula **C** até que seja alcançada a temperatura de esterilização pré-programada. Nesta fase e na seguinte, um sensor de temperatura ligado ao ponto **F** regula a abertura da válvula **C** para que a temperatura de esterilização permaneça dentro da banda de controle definida. Na fase seguinte, chamada de fase de exposição, espera-se por um tempo pré-determinado para que o vapor penetre em todo o material a ser processado e atinja a letalidade mínima esperada, garantindo a esterilidade dos materiais. Durante a fase de exposição às válvulas de vapor nas câmaras interna e externa devem modular compassadamente para manter os parâmetros de temperatura do sistema.

Ao término desta fase, os materiais processados já poderão ser considerados estéreis.

A penúltima fase do ciclo de esterilização é a chamada “fase de secagem”. Nesta fase a bomba de vácuo **G** volta a ligar enquanto que a válvula **C** é fechada, criando-se novamente vácuo na câmara interna. A presença da atmosfera em vácuo aliada à radiação de calor pelas paredes da câmara graças à presença de vapor na camisa **I** faz com que o vapor e parte do condensado restante sejam retirados do material processado, secando-o. A fase de secagem geralmente é caracterizada por uma grande atividade da bomba de vácuo que permanece ligada por um tempo determinado.

Após a fase de vácuo de secagem, temos a última fase que consiste no restabelecimento da pressão atmosférica no interior dos pacotes esterilizados. (LUQUETA, 2010)

3 INDICADOR BIOLÓGICO

Indicadores biológicos são utilizados como indicadores de processo para validar processos de esterilização (processo de eliminação de 99,9999% da população de microrganismos viáveis - esporos e formas vegetativas - de objetos de vidro, metal, tecidos, líquidos e produtos farmacêuticos).

O indicador biológico contém esporos do organismo em papel de filtro dentro de um frasco. A cor e / ou turvação indica alteração dos resultados do processo de esterilização; nenhuma mudança indica que as condições de esterilização foram atingidos, caso contrário, o crescimento de esporos indica que o processo de esterilização não foi cumprida. (Cefar,2010)

Os indicadores físicos e biológicos são recomendados para validar ciclos de esterilização e condições de processamento: os indicadores físicos, termopares conectados a um registrador de temperatura, são distribuídos em diferentes pontos da câmara e da carga, e medem a distribuição do calor, indicando os pontos frios; e os indicadores biológicos, microrganismos resistentes ao agente esterilizante, são utilizados para verificar se as medidas físicas garantem o nível de esterilidade estabelecido (PENNA et al, 1997).

O bioindicador a ser utilizado no processo de esterilização para assegurar o SAL (Sterile Assurance Level) a escolha do microrganismo alvo deve ser feita levando-se em considerações alguns fatores como, por exemplo, resistência do MO ao agente esterilizante, biomassa do contaminante, idade do MO, fatores de proteção externa e atividade metabólica.

Estes fatores, para o bioindicador, devem ser maiores que qualquer outro microrganismo presente no material e/ou produto a ser processado. Tipicamente, para os processos de esterilização a calor, utilizamos como bioindicadores os microrganismos esporulados secos *Geobacillus stearothermophilus* (LUQUETA, 2010)

O calor é o agente esterilizante mais simples, econômico e seguro de que se dispões, contudo a sensibilidade dos diferentes microrganismos à ação do calor é bastante variada, sendo as formas esporuladas as mais resistentes. A eficiência na inativação dos microrganismos é dependente da temperatura, tempo de exposição e presença de água, pois na presença deste são exigidos menores tempo de exposição e temperatura (RDC 17/2010).

O bioindicador adequado deve apresentar uma população de esporos e uma termoresistência ao processo de esterilização superiores àquelas dos microrganismos originalmente presentes no produto a ser esterilizado (PINTO et al., 2010).

4 VALOR DE D

Como foi dito na introdução o valor D, é o tempo em minutos necessário para reduzir a população microbiana em 90%, ou 1 ciclo logarítmico, a uma condição específica, isso é, para uma fração sobrevivente de 1/10. Portanto, onde o valor D de uma preparação de indicador

biológico de, por exemplo, esporos de *Geobacillus stearothermophilus* é de 1,5 minutos sob os parâmetros totais de processo, isto é, a 121 °C, se for tratado por 12 minutos sob as mesmas condições, pode-se declarar que o incremento de letalidade é de 8 D.

O número final de microrganismos sobreviventes expostos ao calor úmido representa o efeito do processo. A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica, equivalente à cinética química de uma reação de 1ª ordem. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição à temperatura constante resulta em curva linearizada decrescente, conforme figura 3. (PINTO et al., 2010).

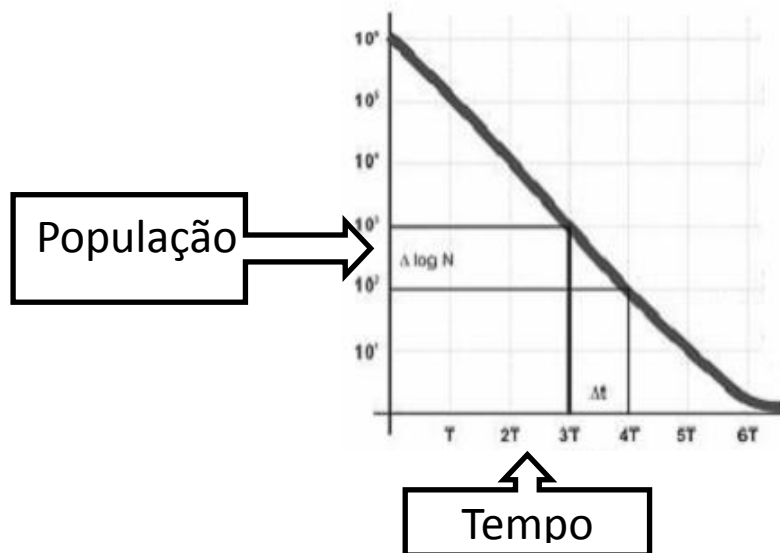


Figura 3 Gráfico semilogarítmico representando uma curva de sobrevivência
 Fonte: LIQUETA, 2010

O planejamento de um processo esterilizante com uma probabilidade definida de ocorrência de sobreviventes depende do conhecimento da população inicial e da cinética inativação desta população, quando exposta ao efeito letal. Para descrever a inativação microbiana e para auxiliar no cálculo de SAL (Sterility Assurance Level).

A constante de velocidade de inativação microbiana é descrita matematicamente pela equação (1)

$$N_t = N_0 e^{-kt} \quad (1)$$

Onde N_t é o número de sobreviventes após o tempo t ; N_0 é o número de organismos no tempo zero, ou seja, a biocarga; t é o tempo de exposição; k é a constante de velocidade de inativação microbiana.

O intervalo de tempo de redução decimal (valor D) é o principal parâmetro de avaliação das características de termoresistência da população microbiana homogênea.

O valor de D é extensivamente empregado nos protocolos de esterilização, é importante verificar os métodos que permitem determiná-lo, sendo mais frequentes o de enumeração e o método quantal. (PINTO et al., 2010).

O valor de D pode ser estimado matematicamente pela equação (2)

$$D = \frac{t}{\text{Log} (N_0/N_t)} \quad (2)$$

Onde:

t é o tempo de exposição, N_0 é o número de organismo no tempo zero (biocarga), N_t é o número de sobreviventes após o tempo t. Na figura 4 mostra a relação do Log N com o Tempo.

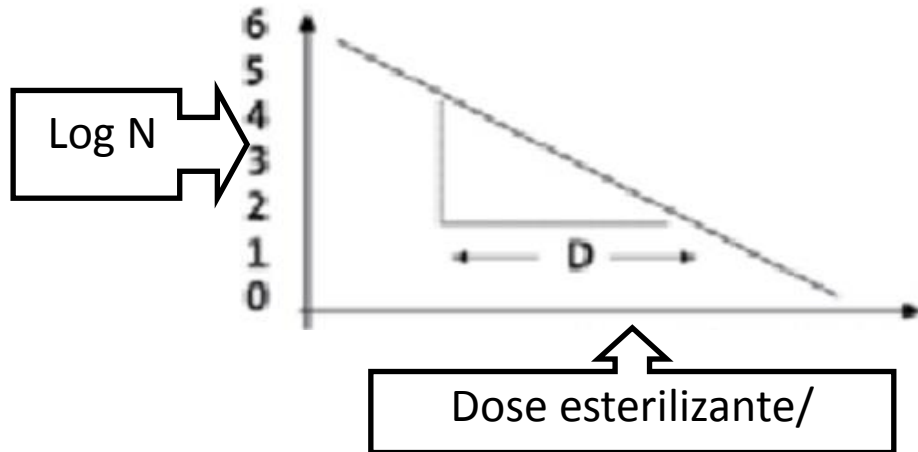


Figura 4 Relação entre dose esterilizante e sobrevivência microbiana, mostrando o valor-D
Fonte: GUILHERME, 2003

A relação entre o valor D e k para uma resposta exponencial é dada pela equação (3)

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (3)$$

Estudos de valor de D são usualmente necessários, sob determinadas circunstâncias, por exemplo, para caracterizar a resistência ao calor do microorganismos isolados do produto, durante desenvolvimento do ciclo de esterilização, quando empregadas abordagens da biocarga ou do bioindicador biológico, para confirmar os valores de D da rotulagem de indicadores biológicos comercialmente obtidos, a serem utilizados durante estudos de validação ou para estabelecer valores D para indicadores biológicos que são preparados por inoculação direta nos materiais ou formulações de produtos com esporos resistentes ao calor.

O valor de "Z" representa o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição, ou seja, determina quantos graus a temperatura de processamento deve aumentar para que o tempo de processamento possa sofrer uma redução decimal.

Quanto menor o valor Z, tanto maior a variação da velocidade de destruição com a temperatura de exposição. (LETRARI et al., 2006).

As medidas de resistência microbiana e as determinações de valor D são efetuadas sob condições isométricas. A alteração na velocidade de inativação com alteração na temperatura é evidenciada ao se calcularem os valores D para temperaturas distintas. Estes valores, quando relacionados graficamente em função da temperatura, conduzem à curva de resistência térmica. A recíproca negativa da inclinação é o valor de Z e representa a elevação na temperatura para reduzir o valor de D em 90%, ou produzir a redução de um ciclo logarítmico na curva de resistência térmica. O valor de Z é expresso em graus de temperatura. Pode ser determinado por diversos métodos, mas o que aparenta ser o mais universalmente aceito envolve a comparação de determinações de resistência térmica a diferentes temperaturas, em escala semi-logarítmica. (PINTO et al., 2010).

Considerando um exemplo em que o valor do indicador biológico é 2 minutos, um tempo de exposição de 16 minutos é necessário para reduzir a população de 10^6 esporos por indicador para a expectativa de 1 esporo em 100 unidades (10^{-2}). Isto sob a consideração de que no meio do ciclo todos os esporos são totalmente inativados. Quando este ciclo é dobrado na operação de rotina, o tempo de exposição será de 32 minutos, o que excede a expectativa de 1 em 1.000.000 de unidade.

A determinação de valores D para indicadores biológicos comercialmente preparados, utilizando conforme instrução do fabricante é recomendada, mas não exigida. (PINTO et al., 2010).

Assumindo que a carga microbiana do produto apresenta resistência ao processo de esterilização igual à resistência do indicador biológico e que a carga inicial do produto é de 10^2 micro-organismos, o incremento de letalidade de 2 D reduziria a carga microbiana a 1 (teoricamente 100) e, conseqüentemente, 6 D adicionais resultaria em uma probabilidade de sobrevivência microbiana calculada de 10^{-6} . Sob as mesmas condições, um incremento de letalidade de 12 D pode ser usado como abordagem típica para obtenção da sobremorte. (Farmacopeia Brasileira, 5ª edição)

A partir do momento que determinamos a letalidade exigida para um ciclo de esterilização, a biocarga e o máximo nível aceitado para o microrganismo sobreviventes devem ser conhecido. Esse nível é conhecido como F_0 .

O tempo do processo de um ciclo de esterilização necessário para permitir um valor F mínimo necessário pode ser determinado estabelecendo o ponto mais frio da carga, empregando termopar, e ajustando o tempo de esterilização de forma que a letalidade integrada na unidade mais fria seja igual ou superior ao valor F requerido. (PINTO et al., 2010).

Tabela 1 Relação tempo/temperatura calculadas para fornecer F_0 de 12 para esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, com D121 de 1,5 minutos e valor de Z de 10°C

Temperatura °C	Tempo
115	48
118	24
121	12
124	6
127	3

Fonte: PINTO et al., 2010

Para o método de esterilização por calor úmido, a condição de referência para esterilização de preparações aquosas é de aquecimento de, no mínimo, 121°C por pelo menos 15 minutos. Combinações distintas de tempo e temperatura podem ser utilizadas, contanto que validadas e que demonstrem a eficácia do processo escolhido, proporcionando um nível adequado e reprodutível de letalidade quando operado, rotineiramente, dentro das tolerâncias estabelecidas. (Farmacopeia Brasileira, 5ª edição)

As condições usualmente especificadas nos protocolos de esterilização térmicas são de 121°C por 15 minutos. A medida do tempo inicia-se quando a temperatura atinge o valor definido.

A British Pharmacopeia, 1988, indica um processo de autoclavagem para preparações aquosas consistindo de 15 minutos, a 121°C , além dos períodos de aquecimento e resfriamento. Tal critério permanece na atual Farmacopeia Européia (PH.EUR.2008b). (PINTO et al., 2010).

Quando desenvolvendo os cálculos do processo, o valor usado para representar o bioindicador é geralmente o máximo número de microrganismos (carga total) encontrados em uma unidade do produto. Porém essa é uma abordagem conservadora, porque a população total pode não ser formada de esporos.

5 CONCLUSÃO

Atualmente a tempo de exposição é variável devido a não possuímos um valor D fixo para os bioindicadores. Verificamos nesse trabalho que para se conseguir o valor D existem algumas variáveis que dificultam a repetição do valor D com o mesmo valor. Porém existe farmacopeias e artigos científicos que nos proporcionam um tempo mínimo para esterilização por meio do calor úmido. Podemos concluir também que a utilização de 10^{-6} para o resultado do ciclo de esterilização é suficiente para se garantir a letalidade total dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

BRASIL. *Farmacopeia Brasileira*. 5^a ed. v.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL, RDC 17 de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

CEFAR. Informativo Cefar de microbiologia: *Geobacillus stearothermophilus*. *Cefar em notícias*. v.2, 37.ed. São Paulo, 2010

GUILHERME, D. *Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*. Ed 11, p. 22-25, 2003.

LETRARI, J. Esterilização térmica e parâmetros de morte microbiana do *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953. *IV ENTEC E II WORKSHOP da UTFPR*. Paraná, 2010.

LUQUETA, G. R. Princípio da esterilização por calor úmido- como funciona uma autoclave. *Controle de contaminação*. São Paulo, v. 36, p. 25-29, 2008.

LUQUETA, G. R. *Esterilização por calor e a cinética de morte microbiana*. São Paulo, 2010.

PENNA, T.C.V. Esterilização térmica. Conceito Básicos da Cinética de Corte Microbiana. *Revista Farmácia bioquímica*. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 1-5, 1997.

PINTO, T. J. A. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 3^o ed. São Paulo: Atheneu, 2010.