

2. Esterilização

2.1 Histórico

A Antiguidade

O conhecimento a respeito do assunto esterilização foi obtido ao longo dos tempos, estando intimamente relacionado ao desenvolvimento da microbiologia, tornando-se praticamente impossível o estudo do primeiro sem nos referirmos ao último. Como se atribui o surgimento da microbiologia à tentativa de solucionar o “problema” da existência da vida e da morte, o conhecimento e o desenvolvimento da esterilização acompanhou passo a passo a solução deste problema.

Desde o início dos nossos tempos o homem parece ter desenvolvido e aplicado, de alguma forma, processos de purificação e desinfecção, sendo este último o precursor da esterilização. Anticépticos tais como o piche ou alcatrão, resinas e aromáticos foram largamente empregados pelos egípcios no embalsamento de corpos mesmo antes da existência de uma linguagem escrita. Do trabalho de Heródoto (484 – 424 a.c), há indicações de que os egípcios eram familiarizados com os valores anticépticos do ressecamento resultante da utilização de certos produtos químicos como o sal comum. A fumaça originada da queima de produtos químicos também era utilizada pelos mais antigos com o propósito de desodorizar e desinfetar.

A purificação de ambientes e a destruição de materiais nocivos e infecciosos através do fogo parece ter se originado também entre os egípcios. A cremação de corpos de animais e de pessoas, especialmente nos casos de guerras, sempre foi pregado pelos mais antigos como forma de descarte, assim como uma maneira de se eliminar odores desagradáveis.

Moisés foi o primeiro a prescrever um sistema de purificação através do fogo e, dos livros Levítico e Deuteronômio, podemos perceber que o mesmo foi responsável pelo desenvolvimento de um processo de purificação de ambientes infectados. Os severos mandamentos dados por Moisés (cerca de 1450 a.c.) a

respeito do descarte de dejetos, sanitização, tratamento e prevenção da lepra, o toque em objetos sujos e a absorção de alimentos não limpos formam a base do primeiro código sanitário estabelecido pelos antigos Hebreus. Digno de nota também, é a proibição da tatuagem (Lev. 19:28) com o intuito de prevenir a transmissão de hepatite através da agulha contaminada e o relacionamento das moscas à transmissão de doenças. Tomando-se como partida as leis estabelecidas por Moisés, vários sistemas de purificação foram adotados (Perkins 1983).

A Descoberta da Bactéria

A existência da bactéria foi considerada possível por muitas pessoas antes mesmo que esta fosse descoberta. A prova de sua existência, por outro lado, teve que esperar o desenvolvimento e a construção de um equipamento adequado à observação e ao estudo das formas de vida microbianas, o *microscópio*. Em 1665 Leeuwenhoek observou e descreveu uma grande variedade de formas microbianas em vários fluidos corporais, descargas intestinais de animais, água e cerveja. Leeuwenhoek também fez importantes contribuições à anatomia microscópica sendo tido, por certas autoridades, como real descobridor dos corpúsculos sanguíneos. As observações de Leeuwenhoek e o desenvolvimento do microscópio foram responsáveis pela criação da bacteriologia e reabriu a questão concernente à fermentação e doença (Perkins 1983).

A Doutrina da Geração Espontânea

Seguindo a descoberta da bactéria, a questão antiga relacionada à geração espontânea de coisas vivas tornou-se assunto de discussão. Alguns poucos indivíduos combatiam a teoria, mas a crença geral era de que as bactérias se originavam espontaneamente e esta crença permaneceu até que *Louis Pasteur* finalmente colocou fim em 1862.

Louis Pasteur

No ano de 1860 Pasteur completou suas pesquisas sobre a causa microbiana da fermentação e estava pronto para iniciar seus estudos sobre o problema da geração espontânea. Pasteur iniciou seu ataque à teoria da geração espontânea com uma investigação microscópica do ar atmosférico, e com a ajuda dos dispositivos mais engenhosos da época, demonstrou que o ar, em diferentes localidades, diferia em seu conteúdo de microorganismos [*Pasteur, L: Memoire sur les corpuscles organises qui existent dans l'atmosphère, examen de La doctrine des generations spontanees. Ann Chimie physique 64:5-110*]. Com a disciplina que lhe era peculiar, Pasteur comprovou experiências antigas realizadas por *Schwann*, *Schroeder* e *Von Dusch*, mostrando que após passar o ar através de um filtro de algodão, este continha partículas organizadas similares em aparência a esporos e, se estas partículas fossem introduzidas em fluidos estéreis e nutritivos, era induzida a fermentação.

A importância desta fase do trabalho de Pasteur pode ser resumida no fato de, onde os investigadores anteriores desenvolviam experimentos visando demonstrar a ausência da fermentação em infusões estéreis em contato com o ar livre de germes, Pasteur não apenas fez isso, como também provou que os microorganismos presentes no ar eram, de forma inquestionável, responsáveis pelas mudanças que ocorriam em suas soluções estéreis.

Um dos últimos defensores da doutrina da geração espontânea foi o médico inglês *Bastian*. Em 1876, *Bastian* atacou o trabalho anterior de Pasteur, o qual estabelecia que a urina, esterilizada através da fervura, não era suscetível à fermentação e nem mostrava evidências de crescimento bacteriano após incubação. *Bastian* afirmava que esta esterilidade era obtida apenas sob certas condições e, se a urina fosse tornada alcalina no início, seria observado, freqüentemente, algum crescimento bacteriano. Como resultado disso, ficou demonstrado que líquidos ácidos poderiam ser tornados estéreis através da fervura, uma vez que certos organismos não destruídos pelo processo de fervura eram incapazes de se desenvolverem em meios ácidos. Por outro lado, se o meio fosse tornado levemente alcalino, as bactérias sobreviventes cresceriam e se multiplicariam livremente.

Esta controvérsia com *Bastian* finalmente levou ao estabelecimento do fato de certos micróbios existentes na natureza serem capazes de resistir a prolongados períodos de fervura a 100°C. Anteriormente acostumado a ferver seus líquidos a uma temperatura de 100°C, Pasteur viu-se forçado a fervê-las agora a temperaturas de 108°C a 120°C, visando assegurar a esterilidade. O costume de levar os líquidos à temperatura de 120°C a fim de garantir a esterilidade data deste conflito com *Bastian*.

Visando alcançar as exigências de métodos mais efetivos e eficazes de esterilização, a temperaturas mais elevadas do que a de ebulição, Pasteur foi levado a desenvolver novos dispositivos e equipamentos. Durante este período (1876-1880) de avanços nas técnicas bacteriológicas, *Charles Chamberland*, pupilo e colaborador de *Pasteur*, foi responsável por desenvolver o primeiro *esterilizador à pressão de vapor*, ou *autoclave*, com o qual era possível alcançar temperaturas iguais ou superiores a 120°C (Metchnikoff, 1989).

O equipamento desenvolvido por *Chamberland* era equipado com uma válvula de segurança e um dispositivo na tampa, que poderia ser aberto para aliviar a pressão gerada pelo aquecimento. O equipamento continha ainda uma pequena quantidade de água e os materiais a serem esterilizados ficavam suspensos acima da água através de prateleiras. Este equipamento pode ser considerado o precursor de nossos esterilizadores modernos.

A Descoberta da Resistência ao Calor da Bactéria.

O físico inglês *John Tyndall* completa a história com a descoberta das fases de resistência ao calor das bactérias. Em 1876 ele fez a sua entrada neste campo com uma série de pesquisas devotadas aos fenômenos da fermentação e da putrefação (Tyndal, 1986). Antes desta época *Tyndall* estava voltado para o problema dos germes e poeiras na atmosfera. Ele acreditava firmemente que os microorganismos presentes no ar estavam associados a partículas de poeira. Com o auxílio de uma engenhosa câmara de madeira equipada com uma frente e janelas laterais em vidro, através das quais era passado um feixe de luz, ele demonstrou

que ar livre de poeira, que não espalhasse o feixe de luz não iniciaria o crescimento em tubos de infusão fervida expostos a ele.

Estudos seguintes realizados por *Tyndall* revelaram que infusões preparadas com feno velho e seco eram mais difíceis de serem esterilizadas por fervura do que aqueles preparados com feno fresco. Esta observação o levou a investigar extensivamente a resistência ao calor das bactérias. Através de inúmeros experimentos, *Tyndall* finalmente concluiu que em certos períodos na história da vida de organismos, estes desenvolvem fases de resistência ao calor nas quais fica mais difícil matá-los, mesmo com fervura prolongada. O estágio de resistência ao calor da bactéria, fase conhecida como *esporo*, também foi detectado por Pasteur e descoberto independentemente pelo botânico alemão *Ferdinand Cohn*, em 1876 [*Ford, W. W.; Clio medica, Bacteriology. New York, Hoeber, 1939, p. 88*].

Tyndall deu origem ao método de esterilização fracionada através do aquecimento intermitente. Este método foi originalmente desenvolvido como um meio prático de esterilizar infusões contendo formas de bactérias resistentes ao calor. O processo consistia no aquecimento de infusões até seu ponto de ebulição em cinco etapas consecutivas com intervalos apropriados de espera à temperatura ambiente. O propósito dos intervalos de espera entre os períodos de aquecimento era permitir o tempo suficiente para os esporos bacterianos resistentes mudarem, ou germinarem em um estágio vegetativo mais susceptível.

A *esterilização fracionada*, que mais tarde ficou conhecida como *Tyndalização*, foi a precursora do esterilizador por vapor sem pressão idealizado por *Robert Koch* e seus associados em 1880-1881. O processo de *Tyndalização* constituiu-se em um importante avanço no desenvolvimento de métodos práticos de esterilização. Sua utilidade e popularidade podem ser comprovadas pelo fato de, nos dias de hoje, este procedimento ser seguido por muitos laboratórios visando a esterilização de meios sensíveis ao calor por 30 minutos, em três dias consecutivos. *Tyndall* concluiu que na história de vida das bactérias podem haver duas fases distintas: Uma termo-sensível e outra incrivelmente termoestável.

Contribuição da Escola Alemã

As pesquisas de *Koch* e seus associados, em 1881, sobre as propriedades desinfetantes do vapor e do ar quente marcam o início da ciência da desinfecção e esterilização. Em colaboração com *Wolffhügel*, *Koch* demonstrou que havia uma diferença marcante no efeito do calor quente sobre uma bactéria, em contraste com o calor úmido. Estes investigadores determinaram que o calor seco a uma temperatura de 100 °C destruía bactérias vegetativas em 1 1/2 hora, porém os esporos mais resistentes (*Anthrax*) exigiam uma temperatura de 140 °C por 3 horas, a fim de assegurar sua destruição. Em conjunto com *Loeffler*, *Koch* investigou a ação germicida do calor úmido (*Koch* e col. 1881). Este estudo mostrou que os esporos de *Anthrax* eram destruídos em água fervente a 100°C em um intervalo de 1 a 12 minutos.

Desinfecção Aérea ou Gasosa

O termo desinfecção aérea foi empregado para significar o uso do ar como um veículo para a difusão de um germicida gasoso em todas as superfícies expostas de um ambiente e seu conteúdo.

A partir da descoberta do gás formaldeído por *Von Hoffman*, de 1867 até 1888, os únicos agentes gasosos utilizados na desinfecção eram o ácido sulfúrico, cloro, ácido hidrocianico, oxigênio, ozônio e ácido nítrico. Em 1888, *Blum* e *Loew* demonstraram as propriedades desinfetantes do formaldeído (*Barnes*, 1903). Mais tarde, *Buchner* descobriu que uma solução a 10% do gás destruiria esporos de *Anthrax*. Este período pode ser definido como o início da desinfecção por formaldeído.

A Esterilização Nos Dias Atuais

O ano de 1933 é tido como o início da moderna esterilização científica. Nesta época a empresa *American Sterilizer* introduziu o primeiro esterilizador por pressão de vapor no qual o controle do processo inteiro de esterilização era centrado na medição da temperatura através de um termômetro de mercúrio

localizado no dreno da câmara, situado no fundo da mesma. Os esterilizadores fabricados e instalados antes de 1933 eram operados tendo como parâmetro de controle apenas a pressão, sem opção de medição da temperatura desenvolvida pelo vapor.

A introdução do controle por temperatura tirou a esterilização de um período marcado por trabalhos científicos de quase adivinhação, remetendo-os a um período de esterilização mais confiável, que permanece praticamente inalterado até os dias de hoje, excetuando-se os modernos controles de automatismo. Praticamente todos os esterilizadores atuais apresentam o mérito de possuírem termômetros capazes de, sob quaisquer condições, indicarem com boa exatidão, a temperatura do vapor aplicado às cargas.

Faz-se mister destacarmos que as três primeiras décadas do século XX testemunharam avanços importantes na ciência e na metodologia da esterilização. Muitos destes desenvolvimentos contribuíram de forma importantíssima para a segurança dos pacientes e do pessoal envolvido na área de saúde. Além disso, a partir destes avanços implementados, finalmente surgiu um claro entendimento e distinção dos princípios científicos envolvidos na esterilização.

2.2 Crescimento e Morte de Microorganismos

Do ponto de vista biológico o processo de crescimento representa um aumento ordenado de todos os componentes de um organismo. Isto significa que uma célula viva é um sistema dinâmico com um padrão específico de organização, imposto por sua estrutura genética, o qual é perpetuado através da assimilação de nutrientes e a habilidade de se reproduzir.

No estudo do fenômeno do crescimento, a taxa na qual o organismo é dividido, ou melhor, o número de gerações ocorridas em um determinado período, apresenta um interesse maior do que simplesmente determinar o número atual de organismos vivos a cada hora. As espécies bacterianas são caracterizadas por uma taxa de crescimento excepcionalmente alta. Como a taxa de crescimento está

diretamente relacionada à taxa de metabolismo, pode-se dizer que quanto maior for o organismo, mais lento é o crescimento.

Na prática, é comum expressar a taxa de crescimento em termos do número de gerações por hora. A geração é definida como a duplicação do número de células ou, em outras palavras, o tempo necessário para a cultura duplicar em concentração ou massa, também conhecido como Tempo Médio de Geração, comumente chamado de *Tempo de duplicação*. Uma vez que organismos unicelulares multiplicam-se em progressão geométrica em um determinado período de tempo, a população total aumenta como uma potência de 2. Se partirmos do pressuposto de que nenhuma célula morrerá durante o processo, essa relação pode ser expressa da seguinte forma:

$$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$$

Os expoentes representam o número de gerações.

Se os logaritmos dos números de organismos em uma cultura em crescimento exponencial for plotado em relação à unidade de tempo, uma relação em linha reta pode ser observada, conforme a figura 1 abaixo:

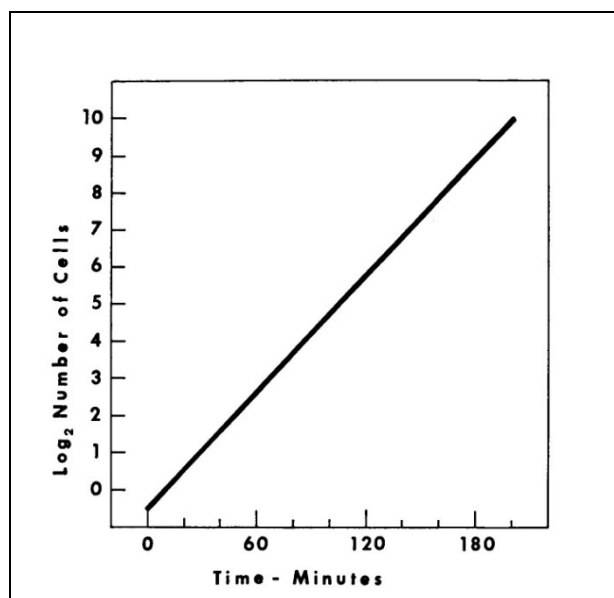


Figura. 1: Crescimento Exponencial típico de microorganismos. O logaritmo do n° de células é plotado em relação ao tempo. [[Perkins, John J., *Principles and Methods of sterilization in Health Sciences*, p. 58]]

Quando a representação gráfica do crescimento exponencial for plotada em uma escala semi-logarítmica, a inclinação da linha registra a taxa de crescimento da cultura. Quanto maior a inclinação da reta, maior a taxa de crescimento da cultura. Da mesma forma, quanto menor for a inclinação da reta ou quanto mais próxima do eixo horizontal, menor é a taxa de crescimento. Quando se é conhecido o número de células presentes em uma cultura em crescimento exponencial em dois determinados períodos, o tempo de geração pode ser calculado diretamente por meio da equação 1:

$$G \text{ (nº de gerações)} = (\log N_1 - \log N_0) / \log 2 \text{ (1)}$$

onde:

$N_0 \rightarrow$ número de células no tempo t_0

$N_1 \rightarrow$ número de células no tempo t_1

Se, por exemplo, a cultura inicial contivesse 100 células e seguisse crescendo exponencialmente até que chegasse a 100.000.000, o número de gerações seria:

$$(\log (10^8) - \log (10^2)) / \log 2 = (8-2) / 0,3 = 20 \text{ gerações.}$$

Se este aumento da população ocorrer no período de 10 horas, a taxa de crescimento seria de 20/10, ou 2 gerações por hora.

A Curva de Crescimento

Estudos realizados com diferentes espécies de microorganismos mostraram que o poder reprodutivo completo das células não pode ser mantido por um período longo de tempo. A população microbiana torna-se limitada pela escassez de nutrientes essenciais, ou quando se desenvolve um equilíbrio iônico desfavorável (pH) ou pela acumulação de substâncias tóxicas no ambiente.

A história de qualquer cultura é marcada por uma série de fases de crescimento relativamente distintas e consecutivas que, quando plotadas, mostram uma curva de crescimento típica (figura 2). Esta curva pode ser dividida em várias seções ou fases como mostradas abaixo e representadas pelas letras de A a H no gráfico.

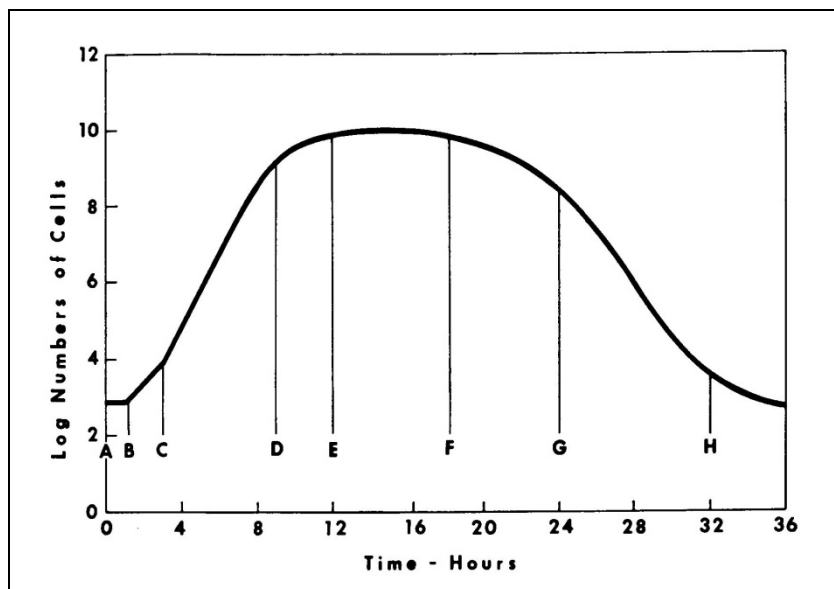


Figura 2: Ciclo de crescimento e morte de uma cultura de bactérias. Os logaritmos dos n^{os} viáveis de células são plotados em relação ao tempo [[Perkins, John J., *Principles and Methods of sterilization in Health Sciences*, p. 59].

Fase Estacionária Inicial

Em seguida à inoculação de células microbianas viáveis em um meio líquido, ocorre um período estacionário, com duração entre 2 e 3 horas, durante as quais o número de células não mostra nenhum aumento em relação ao número de células inicialmente inoculadas. Esta fase é conhecida como *Fase Estacionária* e representa um período de ajuste e adaptação das células ao seu novo ambiente. A fase estacionária estende-se por uma porção da curva de crescimento designada A – B.

Fase Exponencial

O período logarítmico ou exponencial de crescimento é caracterizado por uma taxa máxima e contínua de multiplicação celular em um ambiente específico.

Nesta fase, certos fatores governam a taxa de crescimento, tais como a espécie microbiana, a natureza e a concentração de nutrientes no meio, o pH e a temperatura de incubação. Em culturas líquidas normais, a fase de crescimento exponencial não dura mais do que 2 a 4 horas, podendo ser prolongada através do processo de aeração. Geralmente, quando a concentração de células se torna superior a 1×10^7 ou 10.000.000 por ml, a taxa de crescimento decairá, salvo a adição de oxigênio por meio do processo de agitação ou borbulhamento de uma corrente de ar através do meio.

Durante esta fase, o número de organismos aumenta exponencialmente com o tempo, e quando os logaritmos dos números de células são plotados com relação ao tempo, uma relação em linha reta resulta. Esta característica é mostrada na seção C – D da curva de crescimento representada na figura 2. Ao longo do crescimento exponencial todas as células produzidas são viáveis.

Fase Estacionária Máxima

A fase de incremento logarítmico é seguida por uma fase chamada estacionária, durante a qual o número máximo de organismos viáveis permanece constante. Esta fase corresponde à seção E – F da curva de crescimento. Durante este período a taxa de mortalidade e a taxa de formação de novas células se equilibram. A exaustão do suprimento de alimentação, possível super população e o acúmulo de substâncias tóxicas oriundas do metabolismo são fatores que contribuem para a redução do crescimento e o aparecimento da fase estacionária máxima. Em relação ao tempo, uma cultura pode permanecer nestas condições por horas, talvez dias, antes da morte das células ser verificada. No caso do organismo ser capaz de produzir esporos resistentes, a fase estacionária pode ser prolongada indefinidamente.

Fase de Morte

Com o aumento progressivo na taxa de mortalidade, a cultura entra na fase de morte ou na fase de declínio, mostrada na seção F – H na curva de crescimento. Tão logo uma taxa de mortalidade constante seja estabelecida, a cultura começa a

morrer exponencialmente, até finalmente ocorrer a esterilidade, estando o ciclo de crescimento completo. Precisamos perceber, no entanto, que desvios da ordem exponencial de morte não são incomuns. Por exemplo, depois da maioria das células ter morrido, a taxa de mortalidade pode mostrar um decréscimo marcado pelo fato de um pequeno número de células continue a sobreviver por alguns meses. O crescimento continuado desta pequena população de sobreviventes pode ser atribuído à disponibilidade de nutrientes oriundos de células que morrem e se decompõem lentamente.

O Significado da Morte

Morte microbiana é um fenômeno estatístico. Como aplicada a uma célula individual, a morte representa uma redução irreversível do processo vital, essencial para o crescimento e a reprodução. A morte de microorganismos pode ser medida apenas pela determinação do número de células viáveis na população. Por esta razão, o número viável ou o número de sobreviventes remanescentes depois do contato com uma influência destrutiva é o único meio viável para a determinação da morte.

Critério de Morte

O diagnóstico da morte em uma população de organismos unicelulares não é um processo simples. O único critério prático é a falha do organismo em se reproduzir quando plantado em um meio adequado ou quando sujeito a um ambiente ótimo. A escolha do meio de cultura e as condições de incubação são fatores críticos no teste de viabilidade ou de morte. Um organismo ferido pode crescer em um tipo de meio de cultura, mas não em outro, ou mesmo exibir uma prolongada fase estacionária. Após a exposição a raios-x, luzes ultravioletas ou a certos produtos químicos tóxicos, os organismos podem perder sua habilidade de reprodução, e ainda continuar a sua função de forma normal por um longo período. Estas condições demandam que o meio selecionado para sobrevivência seja especificado cuidadosamente, incluindo propriedades que auxiliem no reparo

de danos celulares adquiridos na exposição a agentes letais, e o tempo de incubação necessário para o crescimento ocorrer.

Mesmo adotando o critério de morte acima estabelecido, é necessário reconhecer que uma célula microbiana pode ser considerada morta apenas quando as condições de teste são mantidas invioladas e permitem a determinação factual da viabilidade ou não. Um ponto que merece destaque é a adaptabilidade da célula microbiana, seu poder de reparo e recuperação e o impacto destas características biológicas sobre a habilidade humana de desenvolver métodos seguros de esterilização, desinfecção e sanitização.

Destruição Térmica de Microorganismos

Tomando-se por base o fato de que a temperatura ideal para o desenvolvimento e crescimento de organismos vivos vai de -5°C a 80°C , podemos concluir que a exposição a temperaturas além desta faixa resultará, provavelmente, na morte destes organismos, com exceção dos esporos resistentes ao calor. Acredita-se que o limite superior desta faixa de temperatura seja determinado pela instabilidade dos constituintes químicos da matéria viva, mais precisamente as proteínas e os ácidos nucléicos, sendo estas substâncias rapidamente destruídas, ou desnaturadas, a temperaturas na faixa de 50°C a 90°C .

O mecanismo responsável pela morte dos microorganismos quando sujeitos ao calor ainda não é claramente entendido. A teoria tradicional prega que a morte de bactérias a temperaturas elevadas esteja intimamente relacionada a alterações em proteínas, gerando alterações protoplasmáticas irreversíveis no interior da célula da bactéria. Alguns pesquisadores afirmam que a morte está associada à inativação por calor de algumas enzimas ou sistemas enzima-proteína na célula. Os outros mecanismos que atuam quando a bactéria é destruída a altas temperaturas tiveram avanço graças aos trabalhos de *Chick* (1906). As medições quantitativas originais de *Chick* contribuíram enormemente para a evolução de uma ferramenta muito útil conhecida como *ordem logarítmica da morte de bactérias*.

Estudos mais recentes nos levam a crer que o modo de ação do calor sobre a bactéria é bastante semelhante à coagulação de proteínas pelo calor. Suportando este ponto de vista, *Amaha* e *Sakagushi* concluíram que a causa da morte dos esporos bacterianos submetidos ao calor úmido possa ser atribuída à desnaturação de uma molécula protéica essencial à célula do esporo (Amaha e Sakagushi, 1957). Deste modo, é bastante razoável concluirmos que o efeito da umidade sobre a temperatura de coagulação da proteína precisa guardar alguma relação com a temperatura na qual a bactéria é destruída. Este ponto de vista foi investigado por *Lewith*, que detectou o fato das proteínas serem coaguladas pelo calor a temperaturas mais baixas quando estas contêm uma quantidade maior de água (Lewith, 1890). Além disso, quando o vapor encontra-se presente, as bactérias são destruídas sob temperaturas bem menos elevadas e em períodos bem mais curtos, diferentemente de quando há ausência de vapor. Este fenômeno pode ser explicado se levarmos em conta que todas as reações químicas, incluindo aqui a coagulação de proteínas, são catalisadas pela presença de água.

Se a freqüência de citações na literatura for um critério, é justo dizermos que hoje é amplamente aceito o conceito de que a morte bacteriana por calor úmido é causada pela desnaturação e coagulação de uma área protéica crítica no interior da estrutura genética da célula conforme a figura 3.

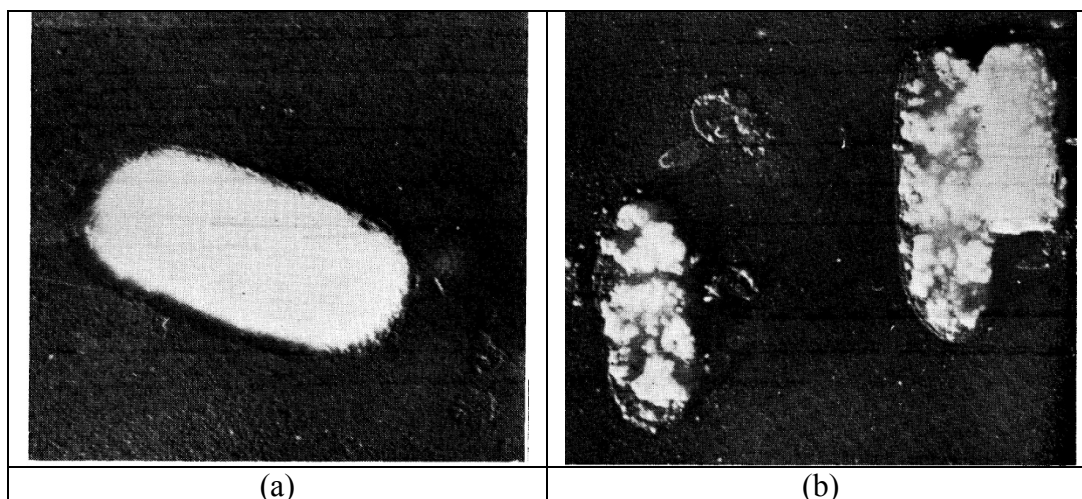


Figura 3: a) *Bacillus Colon* típico, em líquido para cultura após 1 hora, ampliado 28.000 X. Verifica-se a uniformidade aparente do protoplasma celular. b) *Bacillus Colon* após aquecimento em cultura salina por 10 min a 50°C, ampliado 16.000 X. Verifica-se a granulação do protoplasma de forma irreversível [Perkins, John J., *Principles and Methods of sterilization in Health Sciences*, p. 64].

Desnaturação

As proteínas das células bacterianas, muitas das quais enzimáticas, existem em um estado coloidal perfeitamente disperso. Quando submetidas a agentes anti-microbianos tais como: calor úmido, alcoóis ou fenóis, a proteína coagula, se precipita, tornando-se anti-funcional, como no caso do enrijecimento da clara de ovo. Esta transformação envolve uma importante reação característica de proteínas, conhecida como *desnaturação* e implica em mudanças nas propriedades físicas ou químicas da proteína, como a solubilidade, incluindo ainda algumas alterações na estrutura molecular da mesma. Se a exposição ao calor não for prolongada, a desnaturação pode ser revertida, retornando-se às condições nas quais a proteína estava estável. Desta forma, isto significa que é preciso distinguir-se entre a desnaturação reversível ou irreversível de proteínas.

Além do calor, outros agentes capazes de promover a desnaturação das proteínas são: radiação, ultra-som, congelamento, pressão e uma variedade de agentes químicos (ácidos, alcalóides, alcoóis, uréia e detergentes). As reações envolvidas no processo de desnaturação são complexas e ainda pouco entendidas. A importância da desnaturação de proteínas para a esterilização é a ação letal do calor sobre os esporos bacterianos a qual foi registrada por *Chick e Martin*, que caracterizaram a desnaturação protéica como uma reação mononuclear com água [*Chick, H., e Martin, C. J.: On the "Heat Coagulation of proteins. J. Physiol (london), 40:404-430, 1910*].

Ordem de Mortalidade

Quando uma população de microorganismos é exposta a determinada influência esterilizante, a taxa ou velocidade na qual os organismos individuais morrem é diretamente proporcional à concentração ou ao número por unidade de volume em um dado tempo. Geralmente, a ordem de mortalidade, como pode ser determinada experimentalmente, segue um curso uniforme e consistente e é descrita comumente como sendo logarítmica. Isto significa que quando uma população microbiana está em contato com um meio esterilizante, o número de células vivas decresce gradualmente, de maneira tal que o logaritmo do número de

células sobreviventes em um dado momento, quando plotado em relação ao tempo, decresce em uma linha reta como pode ser verificado na figura 4. Apesar de haver evidências que suportem ordens de mortalidade não logarítmicas, os dados coletados desde as medições iniciais de *Chick*, até a presente data, mostram que a morte de células vegetativas, bem como de esporos é essencialmente logarítmica [*Chick, H.: The processo f desinfection by chemical agencies and hot water. J Hyg (camb), 10:237-286, 1910*].

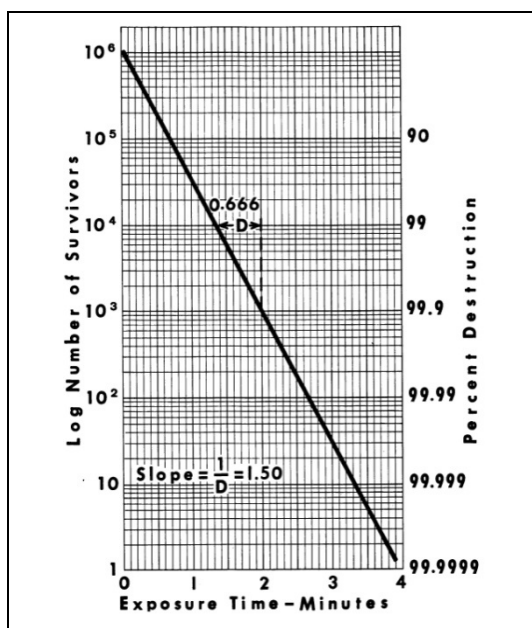


Figura 4: Curva de sobreviventes. O número de sobreviventes é plotado em relação ao tempo de exposição à temperatura constante. O valor $D = 0,666$ min (Perkins 1983).

O conhecimento da ordem logarítmica é importantíssimo, pois permite ao microbiologista computar a taxa de mortalidade constante, designada por K . Este termo expressa, através de um simples número, a *Taxa de Mortalidade*, que apresenta uma relação direta com a eficiência do processo de esterilização. A constância da taxa de mortalidade significa que o número de bactérias que são mortas a cada minuto ou unidade de tempo é um percentual constante do número de bactérias vivas no início de cada novo minuto. É comum expressarmos K através da equação 2:

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{N_0}{N_t}$$

Onde, t = tempo em minutos ou tempo de exposição, N_0 = Número inicial de organismos no início do intervalo de tempo e N_t = Número de organismos sobreviventes no final do intervalo de tempo.

A determinação da taxa de mortalidade possibilita a comparação da resistência ao calor de diferentes organismos à mesma temperatura, ou a resistência de um organismo em particular a diferentes temperaturas. Além disso, possibilita descrever o efeito quantitativo de fatores, como o pH, sobre a esterilização. É importante perceber que a característica logarítmica da ordem de mortalidade implica na morte do mesmo percentual de bactérias vivas a cada minuto. Teoricamente isto significa que a esterilização completa nunca é obtida. A tabela 1 ilustra o caso teórico baseado na premissa de que quando uma suspensão de 1 milhão de bactérias por mililitro é submetida a uma influência esterilizante, 90% dos organismos são mortos a cada minuto de exposição.

Minuto	Bactérias vivas no início do primeiro minuto	Bactérias mortas em 1 minuto	Bactérias sobreviventes ao final de 1 minuto	Logaritmo de sobreviventes
Primeiro	1.000.000	90% = 900.000	1000.000	5
Segundo	100.000	= 90.000	10.000	4
Terceiro	10.000	= 900	1.000	3
Quarto	1.000	= 90	100	2
Quinto	100	= 9	10	1
Sexto	10	= 0,9	1	0
Sétimo	1	= 0,09	0,1	-1
Oitavo	0,1	= 0,009	0,01	-2
Nono	0,01	= 0,0009	0,001	-3
Décimo	0,001	= 0,00009	0,0001	-4
Décimo primeiro	0,0001	= 0,000009	0,00001	-5
Décimo segundo	0,0001	= 0,0000009	0,000001	-6

Tabela 2: Exemplo teórico da ordem de mortalidade de uma população bacteriana

Na coluna de sobreviventes, nos casos de 0,1 ou 0,01 bactéria/ ml, nos dá a informação de que apenas 1 bactéria permanece viva em 10 ml ou em 100 ml da

suspensão. Ao final de 12 minutos de exposição, teoricamente, apenas 1 bactéria ainda permaneceria viva em 1.000.000 de ml, equivalente a 1000 l da suspensão.

Como uma medida prática, o exemplo acima mostra a necessidade de um período proporcionalmente maior de tempo de exposição para a esterilização de um líquido contendo uma alta concentração de bactérias, do que um líquido contendo alguns poucos organismos. Esta condição é verdadeira para a esterilização por calor, desinfecção química ou pasteurização. A aplicação deste princípio é muitas vezes ultrapassada no estabelecimento do período de exposição mínimo para a esterilização de materiais e produtos.

Por exemplo, da figura anterior, $N_0 = 1$ milhão, ou 10^6 organismos, $t = 2$ minutos e $N_t = 1.000$ ou 10^3 organismos. Desta forma:

$$K = \frac{1}{2} (10^6 - 10^3) = \frac{6-3}{2} = 1,50$$

Várias tentativas de explicação da característica logarítmica da ordem de mortalidade têm sido feitas. Uma das mais plausíveis é a proposta por *Rahn*, onde o processo de morte remonta uma reação unimolecular ou bimolecular de primeira ordem (Rahn, 1945). Com isso em mente, a característica logarítmica da ordem de mortalidade é matematicamente possível apenas quando a morte é devida a destruição (desnaturação) de uma simples molécula da célula. A ordem logarítmica é inteiramente impossível se mais do que uma molécula precisar ser inativada para gerar a morte da célula.

A taxa de mortalidade também pode ser expressa através do valor ***D*** ou *Tempo de Redução Decimal*. Este princípio, introduzido por *Katzin* é baseado na aplicação da reação unimolecular constante à morte microbiana sob condições uniformes (Katzin, 1943). Por definição, o valor *D* é o tempo necessário, a uma dada temperatura, para destruir 90% dos microorganismos. Da figura anterior, podemos perceber também que o valor *D* representa o tempo necessário para que a curva de sobrevivência atravesse um ciclo de log.

Quando a taxa de mortalidade é exponencial, o valor D torna-se o recíproco da taxa de mortalidade constante, K, e ambos D e K representam a inclinação da curva de sobreviventes. É importante expressarmos a relação entre estes termos como:

$$D = \frac{2.303}{K} (3)$$

Uma vez que o valor D pode ser determinado para qualquer temperatura, um subscrito é normalmente utilizado para designar a temperatura empregada, como D₂₅₀ ou D₁₅₀.

O Tempo de Redução Decimal (D) é muito importante para a indústria de processamento de alimentos, especialmente na avaliação dos métodos para a preservação de alimentos pelo processamento térmico e em estudos de pesquisa sobre a microbiologia de alimentos enlatados.

Ponto de Destruição Térmica e Tempo de Destruição Térmica

Há alguns anos atrás, dentre os bacteriologistas, surgiu o conceito de que se uma suspensão com bactérias fosse gradualmente aquecida, seria alcançado um ponto na escala crescente de temperatura no qual todas as células na suspensão seriam mortas instantaneamente. Este conceito deu origem ao termo ***Ponto de Destruição Térmica***, sendo este definido como a menor temperatura na qual uma solução aquosa de bactérias é morta em 10 min. Este foi o primeiro padrão de comparação de tolerância ao calor entre organismos de diferentes espécies. O uso deste termo tem sido bastante criticado, tendo em vista o fato de implicar em uma falta de entendimento, pois nos leva a acreditar na existência de uma determinada temperatura que, uma vez alcançada, causaria a morte instantânea de todas as bactérias, sem levar-se em conta o período de exposição, o número de organismos, o ambiente a redor dos organismos e seu estado fisiológico.

Em vista da evidência de que a morte de microrganismos sob a influência de o calor ser um processo ordenado, uma vez que a coagulação da proteína celular é um processo irreversível, precisamos admitir que não existe uma temperatura na qual todas as células em suspensão seriam mortas instantaneamente.

O processo ocorre como uma função do tempo dentro de uma determinada faixa de temperatura. Se a temperatura é aumentada, o tempo pode ser reduzido, ou se a temperatura for reduzida, o tempo precisa ser prolongado. Em outras palavras, a morte de microrganismos pelo calor é uma função dependente da relação tempo-temperatura empregada. Por estas razões, a expressão Ponto de mortalidade térmica tem dado caminho a uma medição de cunho mais prática conhecida como Tempo de Morte Térmica. Estes tempos se referem à determinação do menor período de tempo necessário para matar toda uma população conhecida de microrganismos em uma suspensão a uma dada temperatura.

A natureza do meio nos quais os organismos estão suspensos tem uma importante ligação com o Tempo de Destruição Térmica. Substâncias tóxicas, se presentes, tornam-se crescentemente germicidas com leves aumentos de temperatura. Além disso, os produtos do metabolismo mostram toxicidade aumentada em altas temperaturas. Um pH ácido ou alcalino diminui o Tempo de Mortalidade Térmica, bem como a presença de óleos e gorduras retardam a penetração de calor aumentando o tempo.

Curva do Tempo de Destruição Térmica

Em última análise, a curva do Tempo de Morte Térmica mostra a resistência relativa dos organismos a diferentes temperaturas letais. Esta curva pode ser construída através da plotagem dos Tempos de Destruição Térmica, determinados experimentalmente, sobre uma escala logarítmica e as temperaturas correspondentes em uma escala linear. Tal curva é mostrada na figura 5.

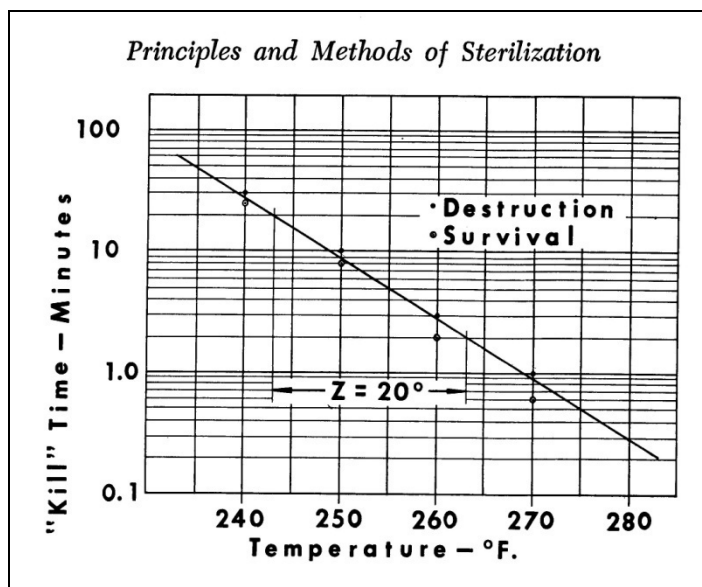


Figura 5: Curva de TMT com tempos de destruição e sobrevivência plotados em relação à temperatura do calor úmido. $Z = 20^{\circ}\text{F}$ ($11,2^{\circ}\text{C}$) [Perkins, John J., *Principles and Methods of sterilization in Health Sciences*, p.72]

É importante percebermos que qualquer valor de Tempo de Morte Térmica não apresenta sentido, a menos que o número de organismos originais seja conhecido, tendo em vista o fato de diferentes populações resultarem em diferentes curvas.

A inclinação da curva na figura 5, simbolizada por Z , é definida como o número de graus necessários para a curva atravessar um ciclo de log. Este número é equivalente ao número de graus de temperatura que precisam ser aumentados ou diminuídos a uma dada temperatura de referência para gerar um decréscimo ou aumento no tempo de destruição. Com uma inspeção mais detalhada na curva podemos perceber que o valor de Z é a medida de como o Tempo de Morte Térmica varia com a temperatura, seguindo daí que, se Z for um valor elevado, a temperatura influirá menos sobre o TMT do que nos casos onde Z é um número pequeno. A maioria dos esporos bacterianos resistentes exibe um valor de Z dentro da faixa de 10 a 15 °C. Na confecção da curva de Tempo de Morte Térmica certas condições precisam ser observadas. Estas condições, como estipuladas por Townsend e col (1938) são:

- Um Ponto de Sobrevivência é considerado um dado positivo e a curva precisa estar acima (temperatura mais elevado ou tempo mais prolongado) de cada um dos pontos de sobrevivência;
- Pontos de Destruição são indicativos, mas não positivos devido ao fenômeno de “saltos” (sobrevivência de organismos após decorrido um tempo além do prescrito para a obtenção de esterilidade). Em geral, uma curva de Morte Térmica deve estar abaixo de tantos pontos de destruição quanto possíveis e acima de todos os pontos de sobrevivência;
- A inclinação da curva de morte térmica deve ser paralela à tendência geral dos pontos de sobrevivência e de destruição.

Estudos do Tempo de Morte Térmica são de suma importância para os estudos no campo da bacteriologia aplicada, como por exemplo, na indústria de enlatados. Deve-se lembrar que os Tempos de Morte Térmica são valores falsamente considerados constantes e imprecisos.

Todas as informações a respeito dos Tempos de Morte Térmica apresentam um certo erro associado, cuja magnitude depende dos intervalos de tempo considerados. O número de sobreviventes nunca é zero, podendo tornar-se muito pequeno, da ordem de 1 em 100 ou 1 em 1000 l.

Resistência de Microorganismos ao Calor

A resistência de microorganismos a agentes destrutivos externos, tais como: calor, produtos químicos e radiações ionizantes formam a base para todos os processos de esterilização e desinfecção. O que precisa ficar claro é que, hoje em dia, nosso conhecimento do “porquê” e de “como” certas espécies são mais resistentes do que outras é muito limitado. Esta situação nos leva ao fato das células bacterianas serem compostas por um sistema altamente complexo, responsável pela habilidade de sobreviver em um ambiente desfavorável. De acordo com Wyss, “quando o estresse é levado ao sistema, três possibilidades se revelam: 1) O sistema entra em colapso e o organismo morre ou deixa de ser viável para a continuação de sua linhagem; 2) O sistema desenvolve mecanismos de resistência; 3) O sistema se altera, acomodando-se temporária ou

permanentemente à presença da influência indesejável.” [Wyss, O.: *Bacterial resistance and dynamics of antibacterial activity*. In G. F. Reddish (Ed): *Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization*, 2^a ed. Philadelphia, Lea & F, 1957, p. 210]

Esporos Bacterianos

Esporo é um estágio latente no ciclo de vida de certos grupos de organismos e constitui uma fase da vida bacteriana, na qual o processo da célula viva é levado a um grau mínimo. Isto não significa que os esporos bacterianos possuem um sistema metabólico inerte. Já se demonstrou que esporos latentes intactos contêm um grande número de enzimas ativas, as quais tornam possível a transformação da célula passiva dormente em uma célula vegetativa crescente em um curto período de tempo em contato com um ambiente favorável. Inicialmente acreditava-se que a esporulação era estimulada por condições adversas como: temperaturas extremas, aridez ou o acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo. Atualmente, parece que várias espécies de bactérias esporulam em ambientes favoráveis.

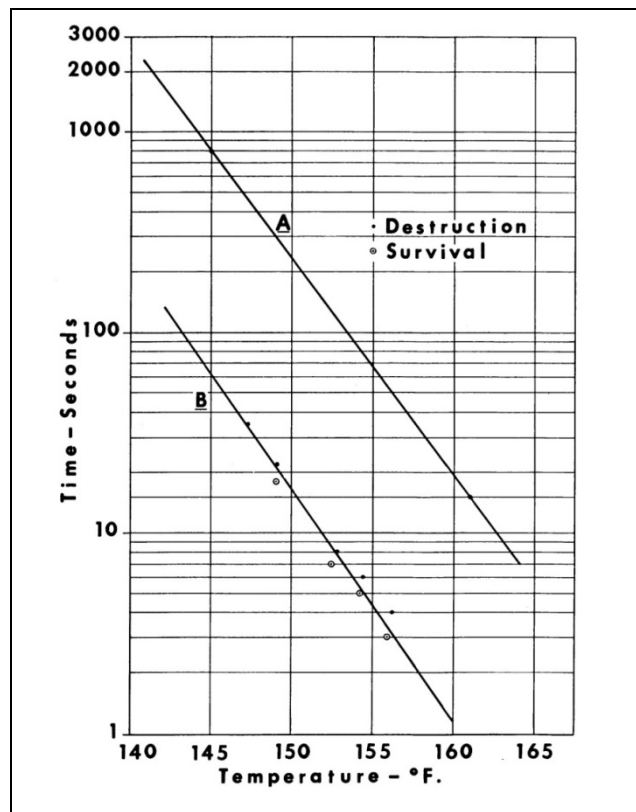


Figura 6: Curvas de resistência térmica. A representa padrões de pasteurização do leite. B, curva do Tempo de Morte Térmica para *M. tuberculosis*, var. Bovis, com uma população de células viáveis de 10^4 /ml de leite. $Z = 8,6^\circ\text{F}$. [Perkins, John J., *Principles and Methods of sterilization in Health Sciences*, p.78, 1983]

Longevidade

Os esporos bacterianos são reconhecidos como os mais resistentes organismos vivos, tendo em vista sua capacidade de suportar agentes externos destrutivos. Os esporos de Anthrax, por exemplos, ressecados em filetes de leite, são viáveis mesmo decorridos 60 (sessenta) anos.

O tempo máximo que os organismos podem sobreviver em um estado dormente é de interesse dos biólogos em geral. Tal informação pode servir de guia para a preservação de culturas, para auxiliar na explicação do mecanismo de dormência, além de auxiliar a responder a questão da transmissão da vida através do espaço

Explicação da Resistência dos Esporos

A partir do estudo da estrutura de formas bacterianas através do microscópio eletrônico, somos levados a crer que os esporos são concentrações densas de protoplasma bacteriano. Existem duas regiões no interior dos esporos: um núcleo de protoplasma denso, e uma casca, ou córtex, de material menos denso. A região interna compreende o bacillus dormente. Como esta pequena massa de protoplasma difere em suas propriedades químicas e físicas do protoplasma de células vegetativas não é claramente entendido. No entanto, a resistência térmica dos esporos, geralmente, é atribuída ao reduzido conteúdo de água ou ao relativamente pequeno conteúdo de sal. Certos pesquisadores mantêm a opinião de que a maior parte da água presente nos esporos é limitada, mantendo-se intimamente associada aos colóides da célula, e como tal, é menos reativa e mais resistente aos agentes químicos e físicos.

Uma das mais destacáveis características dos esporos bacterianos é a sua resistência à inativação pelo calor. O mecanismo específico e as propriedades bioquímicas para esta resistência é assunto de suma importância e foco de pesquisas com implicações práticas na área médico-cirúrgica e na preservação de alimentos e outros materiais perecíveis. A partir de estudos realizados desde 1932, fotomicrografos ultravioletas de bactérias em esporulação revelaram que os esporos em desenvolvimento absorvem luz ultravioleta de forma mais intensa do que as células vegetativas normais. Há cerca de 20 anos atrás, Powel descobriu a substância responsável por essa absorção de luz como sendo o ácido dipicolínico (DPA) [Powel, J. E.: *Isolation of dipicolinic acid from spores of B. megaterium. Biochem J, 54:210-211, 1953*]. Desde a identificação do DPA de esporos aeróbicos, este composto tem sido encontrado em todos os esporos examinados em uma quantidade de 5 a 15 por cento do peso seco. Apesar do DPA ser ter uma importância especial na termoresistência, este não vem a ser um fator determinante da diferença de resistência ao calor das espécies.

O DPA é sintetizado durante o processo de esporulação e completamente perdido, presumivelmente como quelato de cálcio, durante o processo de germinação. Quando uma solução de esporos bacterianos é submetida à inativação

térmica, ocorre uma progressiva perda de DPA, proteínas e outros constituintes da célula. A relação exata entre a inativação dos esporos por calor e a perda deste material celular ainda carece de explicação.

A resistência dos esporos parece variar enormemente de espécie para espécie. Na busca de uma explicação para o mecanismo de resistência, Curran destacou a natureza dos nutrientes no meio produtor de esporos [Curran, H. R.: *Symposium on the biology of bacterial spores. V. Resistance in bacterial spores. Bact Ver, 16:111-117, 1952*]. Um meio deficiente em certos íons metálicos como fosfato, cálcio, magnésio e ferro produz esporos com baixa resistência térmica. O cálcio parece ser um fator de destaque na resistência térmica dos esporos, visto o fato destes possuírem cerca de 10 vezes mais cálcio do que as formas vegetativas. Esporos produzidos em meios pobres em cálcio, mas rico em outros nutrientes parecem ser mais sensíveis ao calor.

Quanto maior a concentração de esporos em um meio, maior é sua resistência e, proporcionalmente, mais calor e maior período de tempo será necessário para a esterilização efetiva. Em grandes populações de 10^7 ou 10^8 esporos, uma pequena fração destes pode apresentar uma extrema resistência ao calor. Descendentes de esporos sobreviventes após tratamento com calor extremo, não apresentam uma tolerância aumentada. A reação do meio é outro importante fator a afetar a resistência ao calor. O pH de máxima tolerância ao calor pode variar de 6.0 a 8.0. Além disso, quando os esporos estão suspensos em materiais oleosos, sua resistência é marcadamente aumentada.

Germinação

Nos últimos anos tem surgido um novo quadro sobre o processo de transformação de esporos dormentes em células vegetativas. Pelo menos 3 (três) diferentes tipos de eventos seqüenciais são reconhecidos na transformação. Estes eventos são conhecidos como ativação, germinação e frutificação. O primeiro passo na quebra da dormência conhecida como ativação ou choque térmico é um processo na qual condiciona o esporo a germinar em um ambiente apropriado. Uma forma comum de ativar um esporo é submetê-lo ao calor. *Curran e Evans*

foram os primeiros a demonstrar sistematicamente que o calor subletal de 62 a 95°C poderia induzir a germinação de esporos dormentes [Curran, H. R., e Evans, F. R.: *Heat activation inducing germination in spores of thermotolerant and thermophilic spores. J Bact*, 67:377-378, 1954]. A germinação pode ser considerada como a mudança de uma fase de resistência ao calor para uma fase de sensibilidade ao calor, a qual pode não ser uma célula vegetativa. Caso a germinação não for ativada após a ativação por calor, o esporo retorna ao seu estado dormente anterior.

No processo de frutificação ocorre a síntese de novas macromoléculas, resultando no surgimento de novas células vegetativas. Keynan e Halvorson mencionaram o fato da ativação ser um processo frequentemente reversível, talvez, com a noção de que isso envolva uma desnaturação reversível de proteínas [Keynan, A., e Halvorson, H.: *Transformation of a dormant spore into a vegetative cell. Spores III. Symposium, Ann Arbor, Michigan, Amer Soc Microbiol, Oct. 1974, p.176*]. Os pontos do esporo ativado desta maneira são no momento desconhecidos. Possivelmente, o desbloqueio de um sistema de enzimas ou a mudança da permeabilidade de alguma estrutura pode ser o responsável pelos efeitos conhecidos da ativação.

Powell, que tem estudado extensivamente a bioquímica dos esporos, resume a hipótese de trabalho da seguinte forma: “O esporo adormecido é uma estrutura altamente condensada, à prova de água, estabilizada pela incorporação de dipicolinato de cálcio e, possivelmente, pela constituição de uma cobertura. Nós imaginamos que uma hidratação e despolimerização desta estrutura ocorre durante a germinação [Powell, J. F.: *Biochemical changes occurring during spore germination in Bacillus species. J Appl Bact*, 20:349-358, 1957].”

Resistências Relativas

Da literatura fica evidente que as autoridades nem sempre concordam com o que diz respeito às exigências para a morte térmica da vida microbiana. Várias relações tempo x temperatura têm sido recomendados para a esterilização por vapor aquecido, alguns dos quais possuem um fator de segurança

proporcionalmente maior do que outros, assegurando a destruição dos esporos mais resistentes. A maior parte da literatura clássica é de pouca valia no estabelecimento de curvas de tempo de morte térmica, tendo em vista a falta de informações essenciais como a população dos organismos utilizados, taxa de aumento da temperatura, pontos de sobrevivência e mortalidade e outras.

2.3 Processos de Esterilização

A esterilização, que vem a ser o processo validado usado para prover um produto livre de todas as formas de microorganismos viáveis (*NBR ISO 11134/2001*), pode ser realizada por meio de processos físicos, químicos ou físico-químicos.

Os processos de esterilização mais utilizados são:

- Físicos
 - Esterilização por vapor saturado sob pressão;
 - Esterilização por vapor seco;
 - Esterilização por Cobalto 60.
- Físico-Químicos
 - Esterilização por vapor de baixa temperatura e formaldeído (VBTF);
 - Esterilização por Óxido de Etileno (ETO);
 - Esterilização por plasma de peróxido de Hidrogênio;
 - Esterilização por pastilhas de para-formaldeído.
- Químicos
 - Esterilização por ácido peracético;
 - Esterilização por glutaraldeído;

Como o presente trabalho tem por foco a esterilização por vapor saturado sob pressão, tal processo é detalhado a seguir.

2.4 Esterilização Por Vapor Saturado Sob Pressão

Segundo as diversas farmacopéias, a esterilidade de um produto é baseada no fato de que o mesmo tenha sido processado em condições ideais e que a amostra representativa submetida a teste, indique a ausência de microorganismos viáveis.

Como o nível de esterilidade absoluta não pode ser garantido graças a uma série de variáveis, deve-se trabalhar de forma a considerar que a esterilidade é um conceito probabilístico. Com isso em mente, considera-se um produto estéril quando, depois de submetido a um processo de esterilização, a probabilidade de sobrevivência de microorganismos viáveis esteja na ordem de 10^{-6} . Este nível de esterilidade recebe a denominação de SAL (Sterile Assurance Level).

Como comentado anteriormente, o resultado de uma série de pesquisas e estudos indica que o melhor método de esterilização vem a ser a esterilização por calor úmido, ou seja, na presença de água. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA, através da RDC 210/2003, em seu item 17.11.1, cita o seguinte:

“A esterilização pode ser feita mediante a aplicação de calor seco ou úmido, agentes gasosos, por filtração esterilizante com subsequente enchimento asséptico dos recipientes finais estéreis, ou através da irradiação com radiações ionizantes. Cada método tem suas aplicações e limitações particulares. Quando for possível e praticável, a escolha do método deve ser a esterilização por calor”.

A preferência por este tipo de esterilização pode ser justificada por apresentar uma série de vantagens como eficácia, velocidade, disponibilidade de metodologias de validação amplamente difundidas, menor risco operacional, boa relação custo/benefício e baixo impacto ambiental.

Ainda na RDC 210/2003, observamos a recomendação pela esterilização por vapor saturado sob pressão ***“17.17.1 – Sempre que possível, os produtos devem ser esterilizados nos recipientes finais, preferencialmente por esterilização por calor úmido...”***.

Vapor saturado vem a ser o vapor d'água, em uma temperatura correspondente ao ponto de ebulição do líquido original a uma determinada pressão (NBR ISO 11134). Além disso, o vapor saturado é a camada de vapor mais próxima da superfície líquida, estando no limiar entre os estados líquido e gasoso, podendo apresentar-se seca ou úmida para esterilização.

O vapor representa um estado físico da água, tal qual o gelo, mas como gás, pode estar próximo ou distante de sua temperatura de condensação ou liquefação. Vapor saturado é o vapor d'água na condição na qual é gerado pela água com a qual está em contato. O vapor saturado não pode obter uma redução de temperatura sem uma redução na sua pressão, bem como não pode ter a temperatura aumentada exceto pelo acompanhamento de uma elevação na pressão. Desta forma, dada a pressão de vapor na qual é formado, sua temperatura pode ser considerada fixa e vice-versa, sendo a pressão e a temperatura itens conversíveis. Desta forma pode-se falar em vapor saturado a uma certa temperatura ou a uma certa pressão. A relação entre pressão e temperatura de vapor pode ser verificada na figura 7.

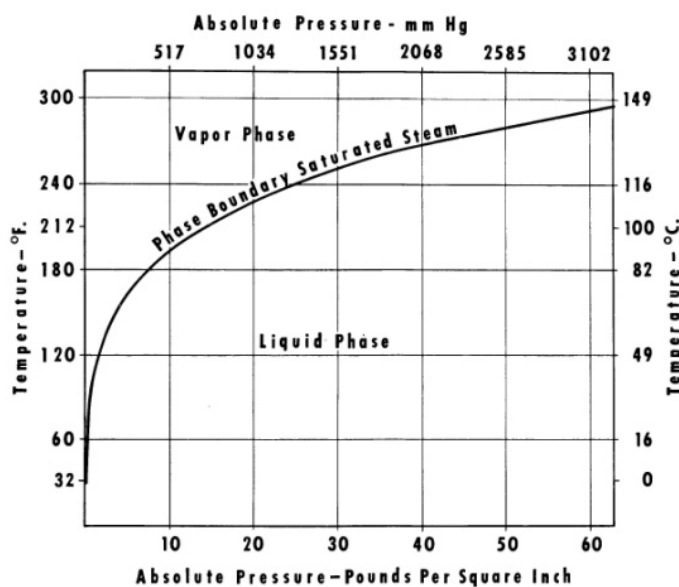


Figura 7: Relação entre temperatura e pressão no vapor [Perkins, John J., Principles and Methods of sterilization in Health Sciences, p.101, 1983]

Mecanismo da Geração De Vapor

A figura 8 a seguir mostra um típico gerador de vapor elétrico. O aparato consiste de um vaso de pressão feito de aço, parcialmente cheio com água e munido de medidor de pressão, termômetro, válvula de segurança, válvula de ajuste de saída de vapor, entrada de água, porta para retorno de condensado e uma fonte de calor.

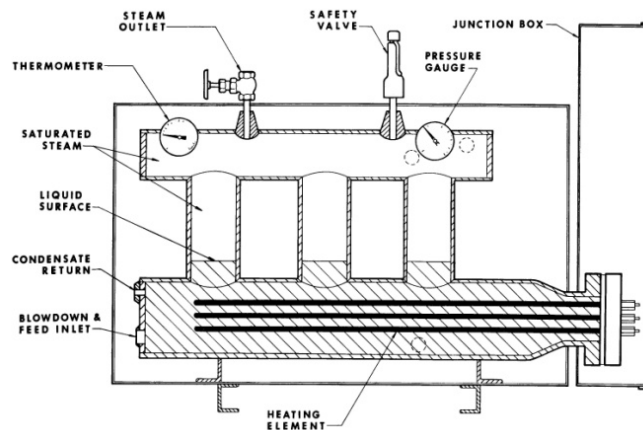


Figura 8: Gerador de vapor elétrico (Perkins, 1983).

A aplicação de calor à água contida no vaso de pressão, caso a saída de vapor esteja aberta para a atmosfera, aumentará a leitura de temperatura do termômetro até 100 °C. Esta temperatura permanecerá constante enquanto o vapor escapa para a atmosfera através da válvula de descarga. Se a taxa de entrada de calor for aumentada ou reduzida, a taxa de descarga de vapor será alterada de forma correspondente, permanecendo, porém a temperatura constante em 100 °C, se a pressão no vaso permanecer constante e igual à pressão atmosférica de 14,7 psi (96,53 kPa).

Durante o processo de aquecimento, bolhas de vapor são formadas na superfície do elemento aquecido. Essas bolhas emergem através da água, atravessam a superfície do líquido e aliviam o vapor no espaço acima da superfície do líquido. O vapor no espaço livre acima do líquido é conhecido como vapor saturado. Caso a fonte de calor seja interrompida temporariamente fazendo com que todas as bolhas de vapor retornem à superfície da água, a água livre de

bolhas é designada água saturada e esta água saturada está a mesma temperatura do vapor saturado. Esta temperatura, por sua vez, também é conhecida como temperatura de saturação.

Quando o calor é aplicado ao gerador e a válvula de saída é parcialmente fechada, restringindo o escape do vapor saturado para a atmosfera, a pressão no vaso aumentará e a temperatura do vapor mostrará um aumento correspondente. Quando esta condição ocorre observa-se que a uma pressão específica, haverá apenas uma temperatura de vapor saturado.

Quando o calor fornecido ao gerador for tal que a superfície do líquido esteja apenas levemente perturbada pelas bolhas de vapor estourando, o vapor gerado será livre de gotas de água e conhecido como *Vapor Saturado Seco*. Podemos dizer que é um contra senso dizermos que o vapor saturado seco não contem água, uma vez que o vapor é um estado físico da água. De um ponto de vista prático, vapor saturado é sempre úmido, uma vez que sempre há uma pequena quantidade de água não vaporizada mantida em suspensão ou misturada com o vapor. O vapor saturado seco, na verdade, vem a ser uma linha teórica de demarcação entre as fases de vapor saturado e superaquecido. Referindo-se ao gerador da figura 8, se o calor fornecido for intenso, ou alto, a superfície do líquido será violentamente perturbada pelas bolhas de vapor que estouram rapidamente, fazendo com que gotas de água fiquem misturadas no vapor e descarregadas através da válvula de saída. O vapor produzido desta maneira é chamado de Vapor Úmido. Este vapor estará à temperatura de saturação correspondente à pressão de vapor, uma vez que o vapor saturado e a água saturada estarão à mesma temperatura.

2.5 Esterilizadores ou Autoclaves

Os tipos de esterilizadores por vapor saturado, ou autoclaves, disponíveis atualmente são basicamente de dois tipos:

- **Gravitacional** – A injeção do vapor na câmara força a saída do ar frio por uma válvula localizada na sua parte inferior. Neste processo pode ocorrer a

formação de bolhas de ar no interior do pacote, o que impede a esterilização. Para que a penetração do vapor ocorra em todos os materiais, o tempo deve ser mais longo, tornando o ciclo mais demorado.

- **Pré-vácuo** – Por meio da bomba de vácuo contida no equipamento, o ar é removido do material e da câmara, podendo ter vários ciclos pulsáteis, favorecendo assim a penetração mais rápida do vapor dentro dos pacotes. Após a esterilização, a bomba de vácuo faz a sucção do vapor e da umidade interna da carga, tornando a secagem mais rápida e completando o ciclo.

Os parâmetros do processo de esterilização de maior interesse são: o vapor, a temperatura, a pressão e o tempo de exposição.

O ciclo de esterilização varia de acordo com o tipo de equipamento. Assim, o ciclo das autoclaves gravitacionais compreende: entrada de vapor, saída do ar da câmara, exposição dos artigos, exaustão do vapor, secagem da carga, retorno à pressão atmosférica e entrada de ar filtrado. Os ciclos das autoclaves pré-vácuo compreende: três pulsos de sucção de ar e entrada do vapor na câmara, entrada de vapor saturado, exposição dos artigos, exaustão do vapor por sucção, secagem da carga, retorno à pressão atmosférica e entrada de ar filtrado.

As autoclaves, de forma geral, vêm de fábrica com ciclos fixos e outros com a opção de serem programados pelo usuário. As possibilidades de parametrização variam conforme as características de cada um dos ciclos, mas no geral contemplam: definição da temperatura de esterilização entre 105 e 134°C (normalmente entre 121 e 134°C); tempo de exposição entre 1 e 999 minutos; número de pulsos e nível de vácuo e pressão na fase de acondicionamento da carga; nível de vácuo e tempo para a fase de secagem, ou temperatura final a ser alcançada no caso de programação lenta.

Em um ciclo típico de esterilização pode-se distinguir 3 fases principais no processo: acondicionamento da carga; exposição e fase de secagem e resfriamento.

Pré-vácuo / Acondicionamento

O contato direto do vapor saturado e o produto a ser esterilizado, com temperatura mais baixa que a do vapor, provoca a condensação e a transferência do calor latente do vapor para estes materiais. É a grande quantidade de energia liberada neste processo de condensação do vapor que vai ser aproveitada para agilizar a destruição ou inativação dos microorganismos.

A existência de ar na câmara e nos pacotes vai interferir neste processo criando bolhas que dificultam o contato direto do vapor com os materiais. Além disso a mistura ar e vapor não é homogênea e sempre possui uma temperatura menor que a do vapor saturado para a mesma pressão.

A principal função desta primeira fase do ciclo de esterilização é a eliminação, a eliminação, a mais completa possível, do ar presente na câmara. Isto é conseguido através de pulsos subseqüentes de vácuo e injeção de vapor. Neste processo, além da eliminação do ar se consegue uma pré umidificação e o aquecimento dos pacotes, o que vai facilitar o alcance dos parâmetros definidos para a fase de esterilização.

Exposição / Esterilização

É durante esta fase que ocorre a destruição ou inativação dos microorganismos. Para que isto ocorra os materiais devem ser mantidos em contato com o vapor pelo tempo e na temperatura definidos para o processo. A autoclave deve ser projetado para permitir um rígido controle desta fase, devendo iniciar a contagem do tempo de esterilização quando for atingida a temperatura programada e a pressão de vapor correspondente. Para o controle destes parâmetros devem ser utilizados um sensor de temperatura e um transdutor de pressão.

Para a manutenção da temperatura de esterilização, o comando da autoclave deve checar continuamente as medições de temperatura e pressão, controlando assim a abertura e o fechamento da válvula de admissão de vapor.

Secagem e aeração

Na fase de secagem e resfriamento a temperatura e a umidade dos materiais expostos no processo devem ser reduzidas a valores que permitam a sua retirada da câmara e posterior manipulação, sem riscos de recontaminação ou de danos ao operador. Isto é conseguido através da manutenção por um período de tempo programado a um determinado nível de vácuo.

No final da fase de secagem e resfriamento é aberta a válvula de admissão de ar na câmara. O Ar é admitido através de um filtro com capacidade de retenção de partículas maiores que 0,22 micras.

A figura 9 a seguir apresenta as fases típicas de um ciclo de esterilização com retirada forçada de ar.

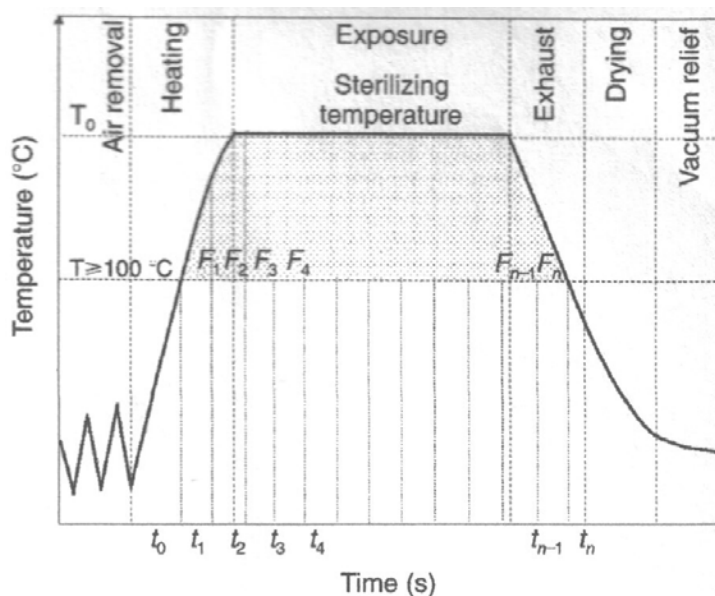


Figura 9: Ciclo de esterilização típico com retirada forçada de ar. Perfil da temperatura em relação ao tempo [B. M. Boca, E. Pretorius, R. Chapoullie, e Z. Apostolides. *NA overview of the validation approach for moist heat Sterilization, part I. Pharmaceutical Technology, 2002*].

A indicação da pressão e da temperatura é feita através de mostradores digitais, tanto no lado da carga como no da descarga, caso seja uma autoclave do tipo de barreira. O sistema de controle de pressão e vácuo nas câmaras interna e externa é realizado através de transdutores de pressão eletrônico. Em alguns casos,

além desses transdutores, o equipamento apresenta manômetros para a indicação da pressão na linha de suprimento de vapor e na câmara externa e manovacuômetro para indicação da pressão de vácuo na câmara interna.

O sistema de controle de temperatura na câmara interna é eletrônico e realizado, normalmente, através de termistores do tipo Pt-100. O sensor de controle de temperatura fica junto ao dreno de descarga de vapor da câmara interna.

Como todo processo que envolve pressão e temperatura elevada, as autoclaves, em via de regra, precisam ser dotadas de sistemas de segurança, com as seguintes características:

- O início do ciclo ou a entrada de vapor na Câmara interna só são liberados com as portas fechadas;
- O comando não permite a alteração de comandos com o ciclo iniciado, sendo igualmente impossível a programação de parâmetros incompatíveis com a estrutura da autoclave;
- Abertura simultânea de ambas as portas, no caso de modelos que possuam o sistema de barreira;
- Válvula de segurança previamente calibrada em 3 bar (300 kPa) e selada.

Atualmente existem diversos fabricantes de esterilizadores por vapor saturado e, no Brasil, adota-se a norma NBR ISO – 11816: Esterilização - Esterilizadores a vapor com vácuo para produtos de saúde.