

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

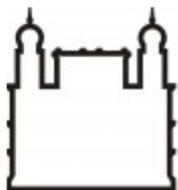
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESCONTAMINAÇÃO NO
SISTEMA ISOLADOR DE BIO-MANGUINHOS**

BEATRIZ CYRANKA

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

BEATRIZ CYRANKA

Otimização do processo de descontaminação no sistema isolador de Bio-Manguinhos

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

Rio de Janeiro

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C997

Cyranka, Beatriz.

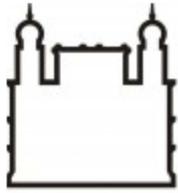
Otimização do processo de descontaminação no sistema isolador de Bio-Manguinhos. / Beatriz Cyranka. – Rio de Janeiro, 2011.
xvi, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.
Bibliografia: f. 61-64

1. Isolador. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Teste de esterilidade 4. Curva de crescimento microbiano 5. Biocidas. I. Título.

CDD 614.48

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob orientação da Prof^a. Dr^a Denise Cristina de Souza Matos e do Prof. Dr José Procópio Moreno Senna.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

BEATRIZ CYRANKA

Otimização do processo de descontaminação no sistema isolador de Bio-Manguinhos

Orientadores: Prof^a. Dr^aa. Denise Cristina de Souza Matos

Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna

Dissertação aprovada em 22 de junho de 2011.

Prof^a. Dr^aa. Elezer Monte Blanco Lemes

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) / Fiocruz

Presidente da Banca Examinadora

Prof.^a. Dr^a. Cleide A. Ferreira de Rezende

UESA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula dos Santos

IOC

Rio de Janeiro

2011

Dedico este trabalho a duas pessoas muito importantes na minha vida, meu companheiro Wagner Nascimento da Costa Junior e minha mãe, Pilar Cristina Cyranka. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer a Deus e a todos os irmãos da espiritualidade que me acompanharam nesse desafio da minha vida profissional.

À Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade de aprimoramento profissional.

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos por proporcionar aos trabalhadores do Instituto o curso de Mestrado Profissional.

Ao Wagner Nascimento da Costa Junior, meu amado companheiro, que carinhosamente me acompanhou nessa difícil jornada no sentido mais amplo da palavra, demonstrando paciência, compreensão e amor no valor mais puro.

À minha mãe pelo incentivo a cada passo conquistado alimentando minha alma com palavras positivas e de conforto nas horas difíceis.

À minha chefe de Departamento Darcy Akemi Hokama que acreditou na minha capacidade me incentivando para o aperfeiçoamento profissional.

Aos meus orientadores Dr^a Denise Cristina de Souza Matos e Dr. José Procópio Moreno Senna pela dedicação, paciência e ensinamentos a mim confiados.

À Dr^a Sheila Farage por gerenciar de forma exemplar o mestrado profissional de Bio-Manguinhos.

À Maria de Lourdes Leal pela orientação para o primeiro passo da confecção do experimento da curva de crescimento dos microrganismos do estudo.

Às secretárias do mestrado no ano de 2009 a 2011 Zaíra Antunes Prado e Andrea Lemos Tavares Ayrosa que acompanharam de perto toda minha evolução nas disciplinas do curso assim como me apoiaram nos momentos tensos durante essa jornada.

À auxiliar de serviços gerais do mestrado profissional de Bio-Manguinhos Michele Clarina Costa Teixeira pela paciência em nos auxiliar com a máquina de fotocópias.

À Madalena de Jesus Vieira pelo companheirismo em fotografar o sistema isolador.

Aos colegas de turma do MPTI/2009 pelo apoio e carinho.

Ao colega Paulo Sergio Gomes dos Santos que gentilmente cedeu os tubos criogênicos contendo os microrganismos para os experimentos no isolador, assim como, permitiu inúmeras vezes a execução de meus testes no fluxo laminar do P3 do DEQUA.

As minhas chefias Lilia Ribeiro Serodio, Josiane Machado Vieira Mattoso e Simone Cascardo Frota por me deixarem a vontade para realizar o Mestrado Profissional de Bio-Manguinhos.

Aos companheiros de trabalho da seção SEPIN pela compreensão da minha limitada ajuda nas tarefas do dia a dia e algumas vezes ausência.

À Izabel Cristina Crespo e companheiros do Laboratório de Controle Físico-Químico que gentilmente cederam o equipamento espectrofotômetro para leitura de densidade ótica das curvas de crescimento dos experimentos.

Ao chefe Marco Alberto Medeiros e companheiros do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) que possibilitaram o término do trabalho cedendo o espaço para utilização do espectrofotômetro, “shaker”, “vortex” e cabina de segurança biológica.

À chefe Maria Teresa Dias Ferreira e companheiros da seção de meios de cultura que gentilmente atendiam as minhas solicitações.

Ao chefe Angelo Maximo Batista e companheiros da seção de lavagem e montagem de material do DEQUA, serviço fundamental para alcançar resultados fidedignos.

Ao Paulo Sergio Gomes dos Santos pela liberação inúmeras vezes do fluxo laminar para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Ao Nilson Cesar Ribeiro pela ajuda na aquisição dos tubos criogênicos.

À Ana Rodrigues que carinhosamente fez o abstract desse trabalho.

Ao Miguel Angel de la O Herrera agradeço pela gentileza dos momentos finais do trabalho e pelo constante bom humor.

À revisora deste trabalho Elezer Monte Blanco Lemes que foi além de revisora, mas sim uma grande contribuinte para que o trabalho fosse lapidado e que agradeço muito a enorme contribuição.

“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades” (Maxwell Maltz).

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Consideração Iniciais.....	1
1.2	Qualidade na indústria farmacêutica	1
1.3	O Controle de Qualidade na indústria farmacêutica	3
1.4	Metodologias empregadas nos processos de esterilização.....	3
1.4.1	Esterilização por processos físicos.....	4
1.4.1.1	Esterilização por calor úmido	4
1.4.1.2	A esterilização por calor seco.....	5
1.4.1.3	A esterilização por radiação ionizante.....	6
1.4.1.4	Esterilização por filtração	7
1.4.2	Esterilização por método químico.....	7
1.4.2.1	Esterilização por óxido de etileno.....	7
1.4.2.2	Esterilização por glutaraldeído	8
1.4.2.3	Esterilização por formaldeído	8
1.4.2.4	Esterilização por ácido peracético.....	9
1.4.2.5	Esterilização por peróxido de hidrogênio	9
1.4.2.5.1	Características do peróxido de hidrogênio.....	10
1.4.2.5.2	Determinação do peróxido de hidrogênio	10
1.4.2.5.3	Características organolépticas do peróxido de hidrogênio	11
1.4.2.5.4	Emprego do peróxido de hidrogênio.....	11
1.5	Controle da eficiência da esterilização	12
1.6	Histórico do sistema isolador.....	12
1.7	Documentações do sistema isolador.....	15
1.8	Propriedades do sistema isolador	15
1.9	Validação do sistema isolador	17
1.9.1	Qualificação de instalação.....	17
1.9.2	Qualificação de operação.....	18
1.9.3	Qualificação de desempenho	18

1.10	Monitoramento ambiental no isolador	19
1.11	Tipos de isoladores	19
1.12	Vantagens do sistema isolador	21
1.13	Isolador de Bio-Manguinhos	22
1.14	Gerador do gás esterilizante, modelo Clarus C	24
1.15	Descrição do teste de esterilidade	25
1.16	Biocidas	26
1.16.1	Mecanismo de ação dos biocidas	27
1.16.2	Classificação dos biocidas	27
1.17	Cinética microbiana	27
1.17.1	Fase de latência de curva de crescimento microbiano	28
1.17.2	Fase exponencial da curva de crescimento microbiano	28
1.17.3	Fase estacionária da curva de crescimento microbiano	29
1.17.4	Fase de declínio ou morte na curva de crescimento microbiano	29
1.18	Microrganismos deste estudo	29
1.18.1	<i>Candida albicans</i>	30
1.18.2	<i>Clostridium sporogenes</i>	30
1.18.3	<i>Micrococcus luteus</i>	31
1.19	Relevância do estudo	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Microrganismos	34
3.1.1	<i>Candida albicans</i>	34
3.1.2	<i>Clostridium sporogenes</i>	35
3.1.3	<i>Micrococcus luteus</i>	35
3.2	Meios de cultura	35
3.2.1	Meios de cultura utilizados para <i>Candida albicans</i>	35
3.2.2	Meios de cultura utilizados para <i>Clostridium sporogenes</i>	36
3.2.3	Meios de cultura utilizados para <i>Micrococcus luteus</i>	37
3.3	Reagentes	38
3.4	Cinética de crescimento	38
3.4.1	Curva de crescimento da <i>Candida albicans</i>	39

3.4.2	Curva de crescimento do <i>Micrococcus luteus</i>	40
3.4.3	Curva de crescimento do <i>Clostridium sporogenes</i>	41
3.5	Curva padrão	42
3.6	Amostras para desafio no isolador	43
3.7	Preparo das suspensões para ensaio de desafio	43
3.8	Inóculo dos microrganismos nos papéis de filtro	43
3.9	Desafio do processo de descontaminação no isolador.....	44
3.10	Avaliação da eficácia do processo de descontaminação no isolador	46
3.11	Roteiro experimental	46
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Resultados da cinética de crescimento da <i>Candida albicans</i>	49
4.2	Resultados da cinética de crescimento do <i>Micrococcus luteus</i>	51
4.3	Resultados da cinética de crescimento do <i>Clostridium sporogenes</i>	53
4.4	Resultados dos microrganismos utilizados no desafio do isolador e suas quantificações.....	54
4.5	Resultados do desafio no isolador.....	55
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT:** Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ADN:** Ácido desoxidorribonucléico
- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ARN:** Ácido ribonucléico
- ATCC:** Agência Americana de fornecimento de cultivo celular (“American type culture Colection”)
- BHI:** Meio de cultura de infusão de cérebro e coração de boi
- Bio-Manguinhos:** Instituto Tecnológico em Imunobiológicos
- DEQUA:** Departamento de Controle de Qualidade
- FDA:** Agência Americana de administração de alimento e medicamento (“Food and Drug Administration”)
- FIOCRUZ:** Fundação Instituto Oswaldo Cruz
- GSK:** Indústria Farmacêutica Glaxo Smith Kline
- Half suit:** Roupas acopladas ao PVC do sistema isolador
- HEPA:** Filtros de ar com alta eficiência (“High efficiency particulated air”)
- INCQS:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- IT:** Instrução de Trabalho
- LACOM:** Laboratório de Controle Microbiológico
- LAFIQ:** Laboratório Físico Químico
- LAMEV:** Laboratório de Metrologia e Validação
- LATER:** Laboratório de Tecnologia Recombinante
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- Pascal:** Medida de precisão de pressão
- QI:** Qualificação de instalação
- QO:** Qualificação de operação
- QP:** Qualificação de performance de equipamento
- PVC:** Policloreto de vinila

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada (RDC 17) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 16 de abril de 2010

SEMEC: Seção de meios de cultura

SEPIN: Seção de Esterilidade Processos e Insumos

TSB: Caldo caseína de soja (“Tryplic Soy Broth”)

TSNI: Agar triptona de soja neutralizada e irradiada

UFC: Medida microbiológica de unidade formadora de colônia

USP: Farmacopéia Americana (“United States Pharmacopeial Convention”)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Sistema isolador com módulo de transferência conectado ao módulo de trabalho do Instituto de Tecnologia em Imunobiológico/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ .	20
Figura 1.2 Módulo de transferência do sistema isolador conectado ao gerador de gás esterilizante e ao fundo o módulo de trabalho do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.	23
Figura 1.3 Gerador de gás de peróxido de hidrogênio Clarus C.	24
Figura 1.4 Bomba de vácuo denominada de Steritest.	26
Figura 1.5 Representação gráfica de curva de crescimento em sistema fechado.	28
Figura 3.1 Primeira e segunda etapas dos experimentos.	47
Figura 3.2 Terceira etapa do experimento.	48
Figura 4.1 Cinética de crescimento, teste e padrão, da <i>Candida albicans</i> , com monitoramento por absorvância em 660 nm com relação ao tempo em hora.	50
Figura 4.2 Cinética de crescimento, teste e padrão, da <i>Candida albicans</i> com monitoramento por UFC com relação ao tempo em hora.	50
Figura 4.3 Cinética de crescimento, teste e padrão, do <i>Micrococcus luteus</i> com monitoramento por absorvância de 660 nm com relação ao tempo em hora.	52
Figura 4.4 Cinética de crescimento, teste e padrão, do <i>Micrococcus luteus</i> com monitoramento por UFC, com relação ao tempo em hora.	52
Figura 4.5 Cinética de crescimento, teste e padrão, do <i>Clostridium sporogenes</i> com monitoramento por absorvância em 660 nm com relação ao tempo em hora.	53
Figura 4.6 Cinética de crescimento, teste e padrão, do <i>Clostridium sporogenes</i> com monitoramento por UFC com relação ao tempo em hora.	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Comparação da ação do biocida peróxido de hidrogênio, com outras substâncias utilizadas em esterilização.	10
Tabela 3.1 Composição do meio de cultura caldo caseína.	36
Tabela 3.2 Composição do meio de cultura Tioglicolato.	37
Tabela 3.3 Composição do meio de cultura caldo BHI.	37
Tabela 3.4 Composição do Glicerol a 10% preparado “in house”.	38
Tabela 4.1 Resultados da cinética de crescimento, teste e padrão, de <i>Candida albicans</i>	49
Tabela 4.2 Resultados da cinética de crescimento da bactéria aeróbica <i>Micrococcus luteus</i>	51
Tabela 4.3 Cinética de crescimento da bactéria anaeróbica <i>Clostridium sporogenes</i>	53
Tabela 4.4 Resultado da suspensão de <i>Candida albicans</i> após desafio no isolador.	54
Tabela 4.5 Resultado da suspensão de <i>Micrococcus luteus</i> após desafio no isolador ...	55
Tabela 4.6 Resultado da suspensão de <i>Clostridium sporogenes</i> após desafio no isolador.	55

RESUMO

Novas tecnologias, como o sistema isolador para ensaios de esterilidade vieram a contribuir com a incorporação de um melhor desempenho destes ensaios no controle de qualidade das indústrias farmacêuticas. Este trabalho teve como objetivo a verificação do processo de biodescontaminação dentro do sistema isolador de Bio-Manguinhos, utilizado como agente esterilizante o gás de peróxido de hidrogênio. Foram utilizadas como biocarga para redução de contaminação microbiológica três concentrações dos microrganismos, *Candida albicans* ATCC 10231, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 e *Micrococcus luteus* ATCC 9341, impregnadas em discos de filtro de celulose. Os estudos de cinética de crescimento dos microrganismos foram realizados para um melhor entendimento do seu metabolismo, bem como aspectos gerais de crescimento que contribuíram para ressaltar que a *Candida albicans* inicia sua fase exponencial de crescimento na segunda hora do cultivo e finaliza esta etapa na sexta hora do cultivo, com produção máxima de células viáveis, fato observado também no microrganismo *Micrococcus luteus*. Para o cultivo do *Clostridium sporogenes* o crescimento foi mais lento com uma curva de crescimento com 60 horas de cultivo total. A produção de maior número de células para o *Clostridium* foi alcançada na vigésima quarta hora de cultivo, assim como a maior produção de esporos. Foi estabelecida, ao longo da curva de crescimento, a relação entre densidade ótica e número de células viáveis, relação essa importante para o estabelecimento das condições do estudo em relação à biocarga empregada de cada microrganismo no momento do desafio no sistema isolador. A capacidade de descontaminação avaliada dentro do sistema isolador com o biocida peróxido de hidrogênio revelou o tempo de exposição ao gás de 10 minutos, como resultado final satisfatório apresentando redução total da carga microbiana com destruição total das células viáveis, assim como as formas esporuladas do *Clostridium sporogenes*. Desta forma conclui-se que o peróxido de hidrogênio é um biocida de eficácia comprovada, nas variáveis deste estudo e o processo de descontaminação no sistema isolador de Bio-Manguinhos é compatível com sua atividade finalística na produção de insumos para a saúde.

ABSTRACT

New technologies such as isolator system for sterility tests came to help with the incorporation of a better performance of these kinds of tests in quality control of pharmaceutical companies. This study aimed to verify the decontamination process within the system isolator of Bio-Manguinhos, using hydrogen peroxide gas as a sterilizing agent. Three concentrations of microorganisms were used as bioburden for the microbiological contamination reduction, *Candida albicans* ATCC 10231, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341, impregnated in cellulose filter discs. Studies of growth kinetics of microorganisms were carried out to a better understanding of their metabolism, as well as general aspects of growth that contributed to emphasize that the *Candida albicans* begins its exponential growth phase in the second hour of cultivation and this step ends at the sixth hour cultivation, with maximum yield of viable cells, this was also observed in the *Micrococcus luteus* microorganism. For the *Clostridium sporogenes* cultivation, growth was slower with a 60 hours growth curve of total culture. The production of more cells for *Clostridium* was achieved in the twenty-fourth hour of cultivation, as well as the maximum spores production. It was established along the growth curve the relationship between optical density and number of viable cells, this relationship was important to establish the conditions of the study related to the bioburden of each microorganism used to challenge the isolator system. The decontamination capacity evaluated within the isolator system with the hydrogen peroxide biocide showed that the gas exposure time of 10 minutes was satisfactory demonstrating total reduction of the microbial load with total destruction of viable cells, as well as the sporulated forms of *Clostridium sporogenes*. Thus it is concluded that hydrogen peroxide is a proved effective biocide, in the variables of this study and decontamination process in the Bio-Manguinhos insulator system is compatible with its main activity in the production of health supplies

1 INTRODUÇÃO

1.1 Consideração Iniciais

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), criado em maio de 1976 é uma Unidade Técnico Científica da Fundação Instituto Oswaldo Cruz que tem como missão “Contribuir para a melhoria da saúde pública brasileira, por meio de inovação, desenvolvimento tecnológico, produção de imunobiológicos e prestação de serviços para atender prioritariamente as demandas do país”.

Neste contexto, o Instituto vem atendendo aos requisitos de qualidade exigidos pelas autoridades regulatórias nacionais e internacionais para colocar no mercado produtos seguros, com qualidade e eficácia comprovadas.

A evolução do Controle de Qualidade na indústria farmacêutica vem acompanhando o avanço das técnicas biotecnológicas, impactando diretamente na rotina dos laboratórios, com a capacidade de aprimorar técnicas, cada vez mais, compatíveis com a natureza dos produtos fabricados, possibilitando assegurar que os mesmos se encontrem dentro das especificações estabelecidas.

Desta forma, Bio-Manguinhos vem criando, adaptando e viabilizando metodologias cada vez mais específicas para acompanhar os sistemas de produção. Em 2002 o Instituto viabilizou a compra de um Sistema Isolador, com dois módulos: um módulo de transferência de material modelo 1994 e outro módulo de trabalho, modelo 1993, de teste de esterilidade para agilizar e aumentar a confiabilidade de seus produtos, proporcionando um ambiente de manipulação de amostras estéril, diminuindo os resultados falsos positivos nos Testes de Esterilidade e em conformidade com as farmacopéias mais usuais.

1.2 Qualidade na indústria farmacêutica

A garantia da qualidade na indústria farmacêutica tem como função prioritária garantir que o produto fabricado esteja dentro dos padrões de qualidade exigidos, afim de que possa alcançar o objetivo final com segurança (ANVISA, 2010).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são práticas que garantem a produção de medicamentos com consistência, dentro dos padrões de qualidade estabelecidos e diminuem os riscos envolvidos durante a produção farmacêutica. Os riscos são constituídos essencialmente por contaminação-cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura de produto. A normatização das BPF é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio de resoluções técnicas que garantem medicamentos de qualidade e conseqüentemente promove a saúde que é um dever do Estado. A BPF no Brasil é regulamentada pela RDC 17, de 16 de abril de 2010 (ANVISA 2010).

A BPF faz parte do Sistema de Garantia da Qualidade das empresas, aos quais devem ter a missão de totalizar as providências tomadas com o objetivo de garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para que possam ser utilizados para os fins propostos (Rosenberg *et al* 2000).

As normas de BPF constituem uma ferramenta importante do sistema de garantia da qualidade. Estas definem e padronizam métodos que regulamentam as atividades de fabricação de produtos, que envolve todos os aspectos para se obter medicamentos de qualidade. Desta forma, para evitar os riscos às indústrias farmacêuticas devem possuir normas que garantam a qualidade na fabricação do produto como:

- ✓ Processos de fabricação estabelecidos de forma clara e objetiva.
- ✓ Equipamentos qualificados, assim como processos validados
- ✓ Equipe treinada e qualificada
- ✓ Áreas do processo de fabricação identificadas
- ✓ Equipamentos apropriados para uso
- ✓ Materiais envolvidos apropriados
- ✓ Procedimentos com aprovação da garantia da qualidade
- ✓ Armazenamento e transporte apropriados (ANVISA 2010).

O controle de qualidade assegura através de testes que o produto está dentro das especificações requeridas utilizando métodos validados, instalações adequadas e equipamentos disponíveis para uso (ANVISA 2010).

1.3 O Controle de Qualidade na indústria farmacêutica

O Controle de Qualidade tem uma posição estratégica dentro das empresas para garantir o melhoramento contínuo da qualidade, de forma a assegurar a satisfação contínua de seus clientes externos e internos, mediante o desenvolvimento permanente da qualidade dos produtos e serviços.

Como função majoritária, o controle de qualidade deve estabelecer as especificações, padronizar e validar os métodos analíticos, utilizando sempre padrões de referência, além de reter e armazenar amostras de lotes aprovados e liberados para o mercado. Deve realizar estudos de estabilidade do princípio ativo e estabelecer o prazo de validade, através de avaliações de estudos acelerados e de longo prazo à temperatura proposta, além do acompanhamento da estabilidade anual (ANVISA 2010).

Um dos grandes desafios encontrados pelo setor é a contaminação microbiológica que pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, alteração das características físicas e aparência e levar a inativação dos princípios ativos e excipientes da formulação e ainda, causar a perda de confiabilidade no produto. Além disso, a administração de produtos contaminados pode agravar quadros clínicos de pacientes já debilitados pela doença (Castellano 1998).

1.4 Metodologias empregadas nos processos de esterilização

A palavra esterilização em sua concepção maior é o processo que promove a eliminação de todas as formas de microrganismos presentes para um nível aceitável de segurança (Rutala 1996).

A eliminação de microrganismos por métodos de esterilização segue leis exponenciais, podendo alguns microrganismos sobreviver ao processo letal, devido requisitos metabólicos específicos. A probabilidade de microrganismos resistirem à esterilização está vinculada com três fatores: o quantitativo de células que foram

submetidas ao processo, a natureza dos microrganismos e a resistência ao processo de esterilização. O nível de garantia de esterilidade de um processo de esterilização é o grau de garantia que o processo possui para realizar a ação de esterilização sobre uma população, estabelecido por meio de estudos de validação (Pinto *et al* 2010).

Os métodos de esterilização devem ser validados, o desempenho destes processos monitorados e o equipamento utilizado deve possuir programa de manutenção preventiva.

Na esterilização, a morte microbiana é descrita em função logarítmica, sendo a esterilização conseqüentemente expressa em termos de probabilidade de ausência de microrganismos com capacidade de sobrevivência (Santos 2009).

A esterilização pode ser dividida em processos físicos, químicos ou físico-químicos.

1.4.1 Esterilização por processos físicos

A esterilização utilizando processos físicos pode ser: através de calor, da radiação ionizante e da filtração. Na esterilização por calor podemos utilizar calor úmido ou calor seco. A esterilização por calor é um processo simples, seguro e econômico e muito empregado na indústria farmacêutica.

1.4.1.1 Esterilização por calor úmido

A Farmacopéia Brasileira define o processo de esterilização como “Método que tem por finalidade remover ou destruir todas as formas de vida, animal ou vegetal, macroscópicas ou microscópicas, saprófitas ou não, presentes no produto considerado, sem garantir a inativação completa de toxinas ou enzimas celulares.” (Pinto *et al* 2010).

De acordo com “Food Drug Administration” (FDA) é possível utilizar-se o termo estéril para descrever a condição microbiológica quando um processo de controle microbiológico for executado por esterilização terminal dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e validado com um ou menos unidades não estéreis em um milhão (Pinto *et al* 2010).

A esterilização por calor úmido utiliza como mecanismo de ação a coagulação das proteínas celulares dos microrganismos, com ruptura das pontes de hidrogênio levando a morte do patógeno. Um exemplo de processo por calor úmido é o vapor saturado sob pressão, realizado em autoclaves com temperatura de 121°C por 15 minutos (Pinto *et al* 2010). Nesse tipo de esterilização há a condensação da água no interior da autoclave, resultando liberação de energia, com elevação da temperatura na biocarga presente, ocasionando destruição dos microrganismos (ANVISA 2010).

Existem alguns interferentes nesse processo capazes de inviabilizar a esterilização que são: temperatura aplicada no processo, tempo de exposição do microrganismo ao calor e ausência de água (Pinto *et al* 2010).

Para microrganismos na forma de esporos, a destruição ocorre devido a ação do calor com a umidade, resultando no amolecimento da cápsula do microrganismo até a quebra resultando na morte do mesmo (Higaskino *et al* 2007).

Um bom esterilizador é aquele que alia eficiência (em termos de letalidade), velocidade e exatidão de parâmetros.

Para alcançar estas premissas é imprescindível que o conjunto conte com instrumentos adequados.

No caso da esterilização por calor úmido, podemos dizer que as principais variáveis de processo são temperatura, tempo e pressão (considerando-se a presença uniforme do agente esterilizante dentro da qualidade exigida). Desta forma, sensores de temperatura, temporizadores e controladores de pressão são os dispositivos críticos.

Se considerarmos que pequenas variações de temperatura demandam grandes variações de tempo para mantermos uma letalidade mínima, quanto mais exato o sistema de controle, mais eficiente será o processo de esterilização (Pflug 1999).

1.4.1.2 A esterilização por calor seco

A eficácia do método esterilizante depende de etapas prévias como a descontaminação, pré-lavagem, lavagem, secagem e empacotamento dos materiais antes da esterilização. Falhas cometidas durante estes passos preliminares comprometem a eficácia da esterilização (Pinto *et al* 2010).

No processo de esterilização por calor seco, o mecanismo de ação ocorre por processos oxidativos sobre as células microbianas, causando uma desidratação progressiva do núcleo das células, em altas temperaturas, por tempo de exposição longo, uma vez que sua característica principal é não ser penetrante como no caso do calor úmido e requer a utilização de temperaturas mais elevadas, que faz-se a ressalva que pode interferir na estabilidade de alguns materiais. Um exemplo de processo de esterilização por calor seco é o empregado em fornos com temperatura de 160°C por duas horas (Farmacopéia Brasileira 2010). A esterilização por calor seco ocupa o segundo lugar dentre os processos esterilizantes mais utilizados nas indústrias farmacêuticas (Pinto *et al* 2010).

1.4.1.3 A esterilização por radiação ionizante

A ação antimicrobiana da radiação ionizante se dá através de alteração da composição molecular das células, modificando seu ADN. As células sofrem perda ou adição de cargas elétricas (Pinto *et al* 2010).

Existem fatores ambientais, físicos e alguns compostos que influenciam na resposta celular à radiação, aumentando ou diminuindo sua sensibilidade a esta. Há também microrganismos que são mais resistentes à radiação, como os esporos bacterianos; as leveduras e fungos têm resistência considerada média e os Gram negativos têm baixa resistência à radiação (Pinto *et al* 2010).

A esterilização por radiação ionizante é realizada por emissões de alta energia de ondas eletromagnéticas ou de partículas que se chocam com os átomos do material irradiado, alterando sua carga elétrica por deslocamento de elétrons. Transformando os átomos irradiados em íons positivos ou negativos podendo gerar hidrogênio livre, radicais hidroxilas e alguns peróxidos, causando lesões intracelulares. As principais fontes de radiação são raios: alfa, beta, gama e raios X (Pinto *et al* 2010).

Particularmente na indústria farmacêutica a esterilização por radiação ionizante apresenta vantagens que são consideradas prioritárias como, por exemplo: os produtos esterilizados já na sua embalagem final, tornando o processo um dos mais seguros quanto ao aspecto de recontaminação, o alto poder de penetração da radiação assegura esterilização de todo o volume do produto, seja líquido, sólido ou gel, principalmente para produtos que apresentem cavidades de difícil acesso e uma

série de materiais são compatíveis com este tipo de radiação (termoplásticos, borrachas, metais, papéis, vidros, etc.) (Cabrera *et al* 2001).

1.4.1.4 Esterilização por filtração

Essencialmente é um método que não destrói, porém remove microrganismos, quando outras metodologias não podem ser empregadas seja pela característica dos produtos ou por sua termoestabilidade. A esterilização por filtração ocorre por remoção física dos microrganismos presente na solução testada, com retenção dos mesmos em membranas filtrantes (Pinto *et al* 2010)

As membranas filtrantes disponíveis no mercado podem ser de: acetato de celulose, nitrato de celulose, fluorcarbonato, polímeros acrílicos, poliésteres, policarbonato, cloreto de polivinila, vinil, nylon, com porosidade de diâmetro de 0,2 micras removem os microrganismos das soluções e do ar (ANVISA, 2000).

Contudo, a maior parte dos vírus é suficientemente pequena para atravessarem os poros destas membranas filtrantes, pelo que esta técnica não assegura a esterilidade total das soluções ou gases filtrados(ANVISA 2000).

1.4.2 Esterilização por método químico

A esterilização por método químico é utilizada para materiais que não são resistentes a altas temperaturas. Nessa classe de esterilização várias substâncias podem ser consideradas como agentes químicos esterilizantes, porém na literatura o óxido de etileno é citado como elemento de referência (ANVISA 2000).

1.4.2.1 Esterilização por óxido de etileno

O óxido de etileno é um agente biocida que possui atividade em fumigação desde 1928, possuindo mecanismo de ação na alquilação das cadeias protéicas microbianas, impedindo a multiplicação celular e causando desnaturação de proteínas. O óxido de etileno elimina a maioria dos microrganismos e endósporos, porém necessita de tempo prolongado de exposição podendo alcançar de quatro a oito horas. É um gás incolor à temperatura ambiente e possui densidade maior do que o ar atmosférico na fase de vapor. A fórmula estrutural do óxido de etileno é representada por CH_2OCH_2 (Higaskino *et al* 2007).

Os efeitos tóxicos do óxido de etileno no homem são: neurofarmacológicos, neurotoxicológicos, reprodutivos teratogênicos e mutagênicos. As indústrias farmacêuticas têm evitado seu uso devido seu caráter nocivo á saúde do homem (Higaskino *et al* 2007). Outros elementos classificados como biocidas químicos são: glutaraldeído, formaldeído, ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Para alguns autores o óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio e o vapor de formaldeído são citados como métodos de esterilização físico-químicos ou esterilização por gases. A eficácia da ação letal está relacionada com a temperatura do gás no momento da injeção na câmara onde ocorrerá o processo. Para os produtos formaldeído e peróxido de hidrogênio a temperatura alta no momento da injeção é obtida pelo aquecimento de soluções aquosas, acima do ponto de ebulição dos mesmos (Pinto *et al* 2010).

1.4.2.2 Esterilização por glutaraldeído

O glutaraldeído é um biocida utilizado em processos de desinfecção na concentração de 2 % (p/v), por um período de tempo de 30 minutos. Seu mecanismo de ação é a alquilação de grupos hidroxila, carboxila e amino dos microrganismos, alterando seu ADN, seu ARN e sua síntese de proteínas. Esse método de esterilização é recomendado para esterilizações de materiais sensíveis ao calor. É um produto extremamente tóxico para o operador sendo o seu uso restrito. O glutaraldeído tem potente ação biocida, sendo bactericida, virucida, fungicida e esporocida. O mecanismo de ação do glutaraldeído sobre esporos é causar reação com a superfície do esporo provocando endurecimento das camadas externas e morte (ANVISA 2000).

1.4.2.3 Esterilização por formaldeído

Na esterilização pelo formaldeído o mecanismo de ação ocorre na alquilação de radicais amino, carboxil, oxidril e sulfidril de proteínas e ácidos nucléicos microbianos, formando pontes metilênicas ou etilênicas, o que impedem que esses compostos celulares realizem suas funções no microrganismo.

Existem vários fatores que impede o seu uso: o efeito carcinogênico no homem, ação lenta sobre esporos podendo levar 18 horas para destruição total das

formas esporuladas, perda de atividade quando os microrganismos estão envoltos com matéria orgânica, odor forte e irritante para olhos e mucosas e presença de resíduo tóxico após o uso (ANVISA 2010).

1.4.2.4 Esterilização por ácido peracético

O ácido peracético é uma mistura entre água, ácido acético e peróxido de hidrogênio que atua oxidando a parede celular dos microrganismos e oxidando elementos do interior dos mesmos, danificando o sistema enzimático levando a morte. Possui como vantagem a ação esporocida mesmo em temperaturas baixas e sua ação não é impedida em presença de matéria orgânica (ANVISA 2000)

1.4.2.5 Esterilização por peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio possui como registro de sua primeira comercialização no ano de 1800, desde essa época, sua produção mundial aumenta a cada ano. Sendo utilizado na forma isolada ou na forma combinada com outras substâncias, é um dos reagentes mais empregados nos últimos tempos (Pinto *et al* 2010).

Seu mecanismo de ação sobre os microrganismos é causar desnaturação de proteínas e ruptura da permeabilidade da membrana celular. A ação letal do peróxido de hidrogênio depende: do tempo de exposição, da temperatura e da concentração do mesmo (Pinto *et al* 2010).

Em comparação com glutaraldeído, o peróxido de hidrogênio (tabela 1.1) é superior. O glutaraldeído possui: dificuldade de validação é um agente que produz carcinogenicidade ao homem, requer alta umidade na área de descontaminação, têm baixo poder de ação e necessita de tempo de ciclo de descontaminação maior que o peróxido de hidrogênio, além de possuir poder de aderência o que dificulta a sua retirada da área de trabalho (Bioquell 2010).

O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através da catálise, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxila (OH), com reatividade inferior apenas ao flúor (Pinto *et al* 2010).

Quando a ação desinfetante do peróxido de hidrogênio é comparada com a ação do glutaraldeído, o peróxido é o que fornece melhores resultados, sendo capaz

de eliminar maior número de esporos de *Clostridium sporogenes* em dispositivos médicos reutilizáveis (Fernandes 2000). Os prions são um desafio nos processos de descontaminação, mas estudos recentes demonstram a eficácia do vapor de peróxido de hidrogênio contra os mesmos (Pinto *et al* 2010).

Tabela 1.1: Comparação da ação do biocida peróxido de hidrogênio, com outras substâncias utilizadas em esterilização (Pinto *et al* 2010).

Biocidas	Bactéria vegetativa	Bactéria na forma de esporos	Inativação por matéria orgânica	Ação de corrosão	Estabilidade do produto em uso
Glutaraldeído 2 %	Muito boa	Lenta	Não	Não	Moderada
Peróxido de Hidrogênio	Muito boa	Lenta	Não	Leve	Muito boa
Ácido peracético	Muito boa	Muito boa	Leve	Sim	Não tem

1.4.2.5.1 Características do peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio também pode ser denominado de: peróxido de dihidrogênio, dióxido de dihidrogênio ou água oxigenada. Possui massa molecular de 34 g/mol, de fórmula química H_2O_2 e é um metabólito natural em muitos organismos que quando decompostos o peróxido de hidrogênio resulta em oxigênio molecular e água. A formação do composto peróxido de hidrogênio pode ocorrer na ação da luz solar sobre a água ou na decomposição de material orgânico (Pinto 1995).

1.4.2.5.2 Determinação do peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio pode ser determinado por volumetria, espectrofotometria, fluorimetria, quimiluminescência, cromatografia ou por métodos eletroquímicos. Com exceção dos métodos eletroquímicos, os métodos citados são vulneráveis a espécies interferentes e geralmente requerem uso de reagentes de preços elevados. O uso de técnicas eletroquímicas são mais seletivas na determinação de peróxido de hidrogênio, demonstrando seletividade e sensibilidade (Mattos *et al* 2003).

1.4.2.5.3 Características organolépticas do peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é um líquido límpido, estável e miscível em água. É comercializado sob a forma de solução aquosa entre 20 a 60% (v/v). Sob temperatura ambiente, o peróxido de hidrogênio é estável quando devidamente armazenado. Pode ser considerado explosivo quando misturado com substâncias orgânicas a determinadas concentrações, resultando um componente bastante perigoso. O peróxido de hidrogênio não tem liberação de gases ou resíduos químicos poluentes na área de esterilização, por isso que hoje em dia nas indústrias farmacêuticas é o biocida de escolha (Mattos *et al* 2003).

1.4.2.5.4 Emprego do peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio possui varias aplicações, podendo ser utilizado no tratamento de água para inibir crescimento microbiano, na oxidação de sulfetos, na destruição de cloro residual, na oxidação de poluentes orgânicos, no tratamento de efluentes industriais para controle de odores, na hidrólise de formaldeído, na destruição de fenóis e na desinfecção por inibição de crescimento de bactérias. Também pode ser utilizado como oxidante de: ferro, sulfetos, solventes, gasolina e pesticidas (ANVISA 2000).

Na forma combinada sua aplicação é nos procedimentos de floculação, precipitação, oxidação de complexos metálicos e incremento do desempenho de floculantes inorgânicos, assim como no tratamento de bioprocessos e desinfecção (Mattos *et al* 2003).

O peróxido de hidrogênio sob a forma de plasma possui como mecanismos de ação a interação com radicais livres que são gerados por substâncias celulares como: enzimas, fosfolipídeos, ADN, ARN, impedindo o metabolismo ou reprodução celular (ANVISA 2000).

O plasma é gerado em câmara selada sob vácuo, empregando radiofreqüência ou energia de microondas, gerando um campo elétrico ou magnético, dando origem à ionização e aceleração das partículas resultantes, que no caso do peróxido de hidrogênio apresenta-se constituído de radicais livres e de formas químicas altamente reativas que se interagem com as membranas celulares, possuindo ação bactericida, esporocida, fungicida e viruscida (Pinto *et al* 2010). O tempo de

exposição para a esterilização com o plasma de peróxido de hidrogênio é de 75 minutos à temperatura de 30 a 40°C (Higaskino *et al* 2007).

1.5 Controle da eficiência da esterilização

A eficiência de um processo esterilizante pode ser medida de três maneiras: pelo histórico do processo, pelo uso de indicadores biológicos ou pelo estudo de inativação de vários microrganismos viáveis (ANVISA 2010).

A avaliação pelo histórico do processo deve conter todos os dados do processo estabelecidos e conhecidos como é o caso da esterilização pelo calor úmido. Sabe-se que para haver uma esterilização por calor úmido o material deve estar: em uma câmara fechada, com pressão e temperatura estabelecidas e deve haver presença de umidade na câmara de esterilização, assim como o tempo de exposição deve ser pré-determinado (Pinto *et al* 2010).

Caso um desses parâmetros esteja fora do estabelecido não se pode considerar que houve eficiência na esterilização (ANVISA 2010).

Na avaliação da eficiência do método de esterilização pelo uso de bioindicadores, o material é descontaminado em conjunto com tiras de papéis contendo microrganismos resistentes, denominados bioindicadores (ANVISA 2010). São denominados dessa forma devido à resistência que esses microrganismos apresentam a processos de esterilização. Esse método utiliza controle da população de biocarga e monitoramento de sua resistência, parâmetros que garantem a eficácia do processo de esterilização (Pinto *et al* 2010). Exemplos de bioindicadores: para confirmação da eficácia do calor úmido *Geobacillus stearothermophilus*, para avaliação do calor seco *Bacillus subtilis_atropheus* e para avaliação da ação do peróxido de hidrogênio ou esterilização por radiação é utilizado o *Clostridium sporogenes* (ANVISA 2010).

O último modo de avaliação da eficácia da esterilização é por meio de estudos do poder biocida de um agente sobre população microbiana conhecida. Microrganismos são expostos a um determinado processo de esterilização e depois são avaliadas as taxas de sobrevivência desses microrganismos (Santos 2009).

1.6 Histórico do sistema isolador

Há quarenta anos às indústrias farmacêuticas vem desenvolvendo sistemas de barreiras físicas, para controle de contaminação microbiana nos produtos estéreis como: vacinas, soros, medicamentos injetáveis e outros produtos com necessidade de área classificadas (Pinto *et al* 2010). O risco de introdução acidental de um contaminante na área de produção decorre de vários fatores como: liberação de pós, gás, aerossóis, podendo ser proveniente de organismos existentes nos materiais utilizados ou provenientes de resíduos de equipamentos, da vestimenta e da pele dos operadores (Horn *et al* 2002).

No período dos anos 60 a 70 as indústrias farmacêuticas utilizavam roupas especiais para servirem de barreira física entre o operador e a área de trabalho, que com o passar do tempo, o sistema de barreira física foi evoluindo chegando à utilização de máquinas automatizadas, nas operações de fabricação de vacinas e medicamentos injetáveis. Também ocorreu aprimoramento na manipulação asséptica de produtos estéreis nas indústrias farmacêuticas, o que gerou melhoria na qualidade dos produtos fabricados diminuindo a contaminação microbiana nos mesmos. Devido à automação nas operações de fabricação de fármacos o conceito de validação apareceu, surgindo também o conceito de validação de processos esterilizantes, assegurando a qualidade dos produtos fabricados (Pinto *et al* 2010).

Inicialmente, o sistema isolador foi fabricado para uso em teste de esterilidade. Nos anos 80, seu uso foi ampliado para manipulação de produtos citotóxicos e também para manipulação de agentes microbianos nocivos para saúde humana (Pinto *et al* 2010). O agente biocida inicialmente utilizado era o formaldeído, que depois passou para o ácido peracético e por fim o peróxido de hidrogênio. O processo de sanitização dentro da área do isolador era inicialmente realizado por fumigação, utilizando como substância esterilizante o formaldeído. Os isoladores da época eram com dimensão limitada e também era limitada a manipulação dentro dos mesmos. A condição de trabalho era desconfortável para manipulação de materiais dentro da câmara e não dispunham de equipamentos que filtrassem o ar dentro do equipamento. Mais tarde os isoladores ganharam filtros HEPA (Filtros de ar com eficiência de 99,97% para partículas de 0,3 μm) gerando ar limpo na cabina por meio de recirculação do ar passando por filtro HEPA com retenção das partículas contaminantes (Pinto *et al* 2010).

Com a barreira criada entre à área de trabalho e o operador, os isoladores se tornaram sofisticados. Luvas deram espaço a mangas e por fim roupas acopladas ao sistema de PVC (Policloreto de vinila).

As roupas são denominadas de “half suit” que são construções bi-laminares que permitem fornecimento de ar para dentro das camadas de roupa de forma independente do sistema de ar do isolador. Devem possuir visor de boa qualidade ótica permitindo ótima visualização no campo de trabalho (Santanna 2007) (Pinto *et al* 2010).

A cada ano que passa mais indústrias farmacêuticas vêm adquirindo o sistema isolador que pode ser utilizado em: controle de qualidade de ensaio microbiológico de teste de esterilidade, em área de produção de produtos estéreis substituindo sala limpa e em pesquisa na manipulação de agentes nocivos a saúde humana (ANVISA 2000). As indústrias estão utilizando o isolador com o objetivo de minimizar a questão da contaminação em sala limpa (Pereira 2010)

A primeira firma no Brasil que obteve o equipamento isolador foi a Pfizer em 1995, para uso em teste de esterilidade. Depois em 1997, foi à vez da Eli Lilly, mais tarde denominada de ABL, que obteve o sistema isolador para substituir sala limpa na área de produção. No mesmo ano, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ) adquiriu o isolador para teste de esterilidade e um ano depois foi a vez da GSK (Glaxo Smith Kline) que também adquiriu com o propósito de teste de esterilidade, assim como, Eurofarma em 2000 e o Instituto Butantã em 2007 (Colaço 2009).

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ adquiriu o equipamento isolador no ano de 2002, para o ensaio microbiológico de teste de esterilidade seguindo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). O propósito da obtenção desse equipamento foi inovar a maneira de realizar o teste de esterilidade eliminando os resultados falsos positivos. Esses resultados ocorrem na maioria das vezes quando há falha por parte do operador no procedimento do uso da vestimenta de sala limpa.

Antes da invenção do isolador o operador era um fator de contaminação nos testes de esterilidade, sendo as conclusões dos testes duvidosas. As indústrias farmacêuticas vêm adquirindo o equipamento para garantir resultados mais confiáveis, assim como para criar proteção para os operadores contra particulados e aerossóis, o que confere um caráter positivo em se tratando de biossegurança.

1.7 Documentações do sistema isolador

As primeiras documentações a respeito do isolador surgiram em 1977 no Anexo I do guia de boas práticas de fabricação da Comunidade Européia (EU GMP “guidance”), porém o documento não era completo, havendo necessidade de mais orientações sobre sua utilização. Mais tarde, entre os anos de 1998 a 2000, muitas indústrias farmacêuticas adquiriram isolador para atuar em suas operações, gerando necessidade de publicações regulatórias que servissem de guia para utilização do equipamento. Assim surgiram as primeiras publicações a respeito do isolador: “Isolators used for aseptic processing and sterility testing” no “Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme” na ISO/DIS Standard 14644-7, “Cleanrooms and Associated Controlled Environments” e “Baseline Guide on Sterile Manufacturing Facilities” publicado por “International Society for Pharmaceutical Engineering”.

Em 1999 no “European Journal of Parenteral Sciences”, foram abordados vários aspectos sobre isolador e em 2002 a FDA atualizou e ampliou a publicação de 1987 no capítulo “Sterile drug Products produced by Aseptic Processing” que aborda a questão da integridade da luva utilizada no isolador.

Na Farmacopéia Americana (USP) o assunto isolador foi abordado a partir da 30ª edição, no capítulo “Validation of Isolator Systems” <1208>. E no Brasil, a documentação regulatória do isolador iniciou na Resolução da Diretoria Colegiada nº 17 de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com publicação na seção VII sob o título: Tecnologia de isoladores, onde trata de critérios para uso.

1.8 Propriedades do sistema isolador

O sistema isolador é definido como ambiente controlado por possuir parâmetros de: temperatura, umidade, pressão e barreira física eficiente contra a penetração de microrganismos na área de trabalho. O equipamento é classificado segundo suas características ambientais de classe A, ou seja, a zona para operações é de elevado risco, possuindo fluxo laminar que proporciona um débito homogêneo de ar entre 0,36 a 0,54 m/s (metro por segundo) na área de trabalho. Cada operação executada no isolador requer uma limpeza adequada em seu interior

de modo a minimizar os riscos de contaminação por partículas ou por células microbianas, do produto ou dos materiais manuseados (Comissão Europeia 2003).

O isolador possui como critério de limite de contaminação microbiológica dentro da área de trabalho, menos que uma unidade formadora de colônia (UFC) segundo o programa de avaliação para salas limpas e ambientes controlados da Farmacopéia Brasileira. Esse é o mesmo critério para resultados obtidos através de: aparelhos coletores de ar, placas de sedimentação, placas de contato e teste nas luvas com placas de contato (Farmacopéia Brasileira 2010).

Os limites estabelecidos de partículas para trabalhar no isolador em operação são: partículas de tamanho $\geq 0,5 \mu\text{m}$ - 3.520 unidades e para partículas de tamanho $\geq 5 \mu\text{m}$ - 20 unidades, limites estabelecidos segundo classificação da OMS independente do tipo de isolador (Krippner 2010).

A classificação da qualidade do ar, recomendado pela OMS, no ambiente circundante ao isolador, quando esse estiver em operação com processos assépticos, é classe D, significando que o limite recomendado de contaminação microbiológica na área circundante ao isolador é de 200 UFC por metro cúbico de ar.

Para análise da contaminação do ar na área ao redor do isolador, pelo método de sedimentação de microrganismos em placas de Petri com meio de cultura, o limite é de 100 UFC por período de tempo de 4 horas de exposição das placas (Horn *et al* 2002).

O sistema isolador possui estanqueidade de duas maneiras: quando selado fisicamente ou quando adquire a propriedade de ser selado devido à aplicação contínua de pressão. É constituído de aço inox AISI 316, o que confere uma estrutura resistente a fissuras ou corrosão não havendo formação de acúmulo de partículas. Possui mecanismo de insuflamento e exaustão de ar através de filtros HEPA, favorecendo uma qualidade do ar apropriada para testes em área limpa (Bioquell 2000).

A descontaminação no interior do equipamento é realizada através de um gerador de gás esterilizante, podendo o gás ser de: peróxido de hidrogênio, ácido peracético ou dióxido de cloro (Bioquell 2000).

No isolador a esterilização deve ser validada para um nível de garantia de esterilidade 10^6 , ou seja, pode ocorrer no processo de esterilização a probabilidade de um microrganismo viável existir em um item dos 1.000.000 itens esterilizados de produto final. O nível de garantia de esterilidade de um processo de esterilização

traduz a segurança com que o processo em questão esteriliza um conjunto de itens, sendo expresso como a probabilidade de um item não estéril naquela população (Farmacopéia Brasileira 2010). Deve-se ter o cuidado no procedimento de limpeza do isolador, para que o processo possa auxiliar na eliminação de biocargas que possam estar presentes dentro do equipamento. A limpeza do equipamento deve seguir as normas existentes no guia de limpeza da ANVISA.

Para entrada e retirada de material do isolador o operador deve seguir procedimentos padrão de operação, para evitar entrada de contaminantes na área de trabalho (ANVISA 2000).

A contaminação na área de trabalho do isolador pode ocorrer se, o sistema de filtração de ar possuir algum vazamento, se houver surgimento de biofilmes ou se o sistema for exposto ao ar externo durante a operação manual de limpeza. Para que o funcionamento do isolador tenha garantia em sua aplicação e confiabilidade este deve ser validado anualmente (Horn *et al* 2002).

1.9 Validação do sistema isolador

A validação do sistema isolador deve ser realizada levando em consideração os fatores críticos da tecnologia de isoladores e deve abranger a eficácia dos ciclos de esterilização, assim como, confirmar a redução dos resíduos dos agentes esterilizantes na unidade. A validação de um processo deve ser estabelecida e documentada, demonstrando as características de exatidão, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (Pinto *et al* 2010). A validação é constituída por qualificações, mas as etapas individuais de qualificações não constituem sozinhas uma validação de processo (ANVISA 2010).

A validação do processo de teste de esterilidade dentro do sistema isolador está vinculada com três qualificações do equipamento: a qualificação de instalação denominada de QI, a qualificação de operação denominada de QO e a qualificação de desempenho denominada de QP.

1.9.1 Qualificação de instalação

Na qualificação de instalação os parâmetros verificados são:

- ✓ Calibração de instrumentos
- ✓ Conformidade do equipamento com o trabalho a ser executado
- ✓ Avaliação do material que é construído o equipamento
- ✓ Certificação dos filtros HEPA
- ✓ Certificação do sistema computacional do gerador de peróxido (Santana 2007).

1.9.2 Qualificação de operação

Na qualificação de operação os parâmetros avaliados são:

- ✓ Conformidade do equipamento com as especificações do trabalho a ser executado
- ✓ Funcionamento dos alarmes
- ✓ Funcionamento dos ajustes de: temperatura, umidade e pressão em conformidade com o trabalho
- ✓ Integridade do isolador
- ✓ Estanqueidade do equipamento
- ✓ Ciclo de descontaminação do equipamento
- ✓ Ação do agente esterilizante
- ✓ Ciclo de limpeza (ANVISA 2010).

1.9.3 Qualificação de desempenho

Na etapa de qualificação de desempenho, os parâmetros verificados são:

- ✓ Eficácia e reprodutibilidade do processo de esterilização para cargas microbiológicas definidas e
- ✓ Boas práticas de controle de qualidade do operador

Após o isolador estar com todas as qualificações efetuadas e a validação confirmada é garantido utilizar o equipamento com segurança, porém deve haver um programa de monitoramento ambiental rotineiro durante a execução do teste no isolador para que seja confirmada a ausência de microrganismos viáveis. Deve ser

incluído na rotina do laboratório o teste de vazamento do isolador e das luvas/mangas (ANVISA 2010).

1.10 Monitoramento ambiental no isolador

O monitoramento microbiológico do isolador deve ser executado de forma semelhante ao preconizado para salas limpas. Deve incluir amostragem ativa do ar, exposição de placas de Petri com meio de cultura, “swabs” de superfície e eventualmente testes de luvas. A amostragem ativa do ar é realizada por equipamento que realiza sucção do ar da área de trabalho para dentro do aparelho a um volume de ar preconizado pelo fabricante assim como o tempo gasto na sucção de amostra de ar (ANVISA 2010).

Para monitoramento ambiental são utilizadas placas de Petri com meio de cultura para serem expostas ao ambiente de trabalho. Alguns cuidados devem ser levados em consideração como, o tempo utilizado para exposição das placas, não deve ultrapassar de 1 hora para que não haja ressecamento do meio de cultura, as placas após o processo devem ser incubadas à temperatura entre 20-25°C por 3 dias , seguida de incubação à 30-35°C por 2 dias, para que possa ser detectada a presença de microrganismos contaminantes como bactérias ou fungos (Bio-Manguinhos 2011).

Outro tipo de monitoramento ambiental que pode ser aplicado é o teste com as luvas do equipamento. Que é realizado através imersão em água peptonada estéril com conseqüente filtração da água, com o intuito de verificar se as luvas estão isentas de contaminantes (ANVISA 2010).

1.11 Tipos de isoladores

Os isoladores podem ser divididos de várias maneiras: constituição física, tipo de troca de ar, número de luvas ou número de roupas acopladas no equipamento ou tipo de pressão no interior dos módulos.

Com relação à constituição física, podemos ter isolador de parede flexível ou isolador de parede rígida. O isolador de parede flexível possui estrutura de PVC envolvendo bancada de inox, o que confere estanqueidade ao sistema. O isolador de parede flexível é particularmente utilizado para teste de esterilidade, por permitir

mobilidade ao operador na hora de execução dos testes. O isolador de parede flexível (Figura 1.1) possui acoplada a bancada de inox, bomba de vácuo com função de auxiliar no teste de esterilidade.

O isolador de parede rígida é constituído de aço inox com janelas de vidro onde a estanqueidade do equipamento ocorre devido a sua estrutura ser selada. É utilizado para área de produção onde o material sai direto da autoclave para dentro da área de trabalho (Santanna 2007).

Com relação ao tipo de troca de ar no isolador, podemos ter isolador denominado aberto ou isolador fechado.



Figura 1.1 Sistema isolador com módulo de transferência conectado ao módulo de trabalho do Instituto de Tecnologia em Imunobiológico/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (foto capturada por Madalena de Jesus Vieira).

O isolador aberto é quando ocorre com frequência a entrada e saída de material de dentro do equipamento. Facilitando a troca de ar com o meio ambiente, sem passar pelo filtro HEPA. No isolador fechado, a troca de ar com o meio ambiente ocorre sempre através de filtro HEPA, esse tipo de isolador é utilizado na manipulação de produtos citotóxicos para proteção do operador, onde o ar contaminado não tem acesso ao ambiente ao redor (Santanna 2007).

Podemos ter isolador somente com duas luvas, assim como, isolador com quatro luvas, o que difere para escolha do quantitativo de luvas é o tipo de trabalho a

ser executado no equipamento, o mesmo ocorre para a quantidade de roupas acopladas ao PVC (Pinto *et al* 2010).

Com relação à pressão interna do isolador podemos dizer que existem isoladores com pressão positiva e isoladores com pressão negativa. Os isoladores com pressão positiva são utilizados para teste de esterilidade, onde a pressão interna no módulo é maior que a pressão atmosférica ao redor, nesse caso o fluxo de ar é de dentro do isolador para fora. E para isoladores de pressão negativa, a pressão interna é menor que a pressão ao redor. Nesse caso o isolador é utilizado para manipulação de produtos nocivos à saúde do operador, como exemplo produtos citotóxicos (STEQ 2010).

1.12 Vantagens do sistema isolador

A maior vantagem do isolador é a separação entre o operador e a área de trabalho. O isolador foi construído para alguns propósitos e um deles é a substituição da sala limpa convencional (STEQ 2010).

Compreende-se como sala limpa a área de trabalho para manipulação de materiais assépticos onde existe controle ambiental por partículas viáveis e não viáveis. Na sala limpa há parâmetros definidos de: temperatura, umidade, pressão e suprimento de ar, estabelecido com o intuito de minimizar contaminantes nas salas (Farmacopéia Brasileira 2010).

A sala limpa é projetada, construída e utilizada de forma a reduzir a introdução, geração e retenção de microrganismos em seu interior. O operador deve possuir treinamento quanto à colocação da vestimenta da sala limpa, para não servir de carreador de contaminantes (Farmacopéia Brasileira 2010)

As vantagens do isolador em comparação com sala limpa são:

a) O isolador ocupa menor espaço, a área destinada à localização do isolador pode ser dentro de qualquer sala de laboratório, não havendo necessidade de nenhuma construção própria, a sala limpa requer construção direcionada com as exigências que uma área limpa necessita.

b) O isolador protege o produto da contaminação do ambiente e de pessoas, de maneira eficaz devido ao sistema estanque. Na área limpa o operador penetra na área de trabalho podendo carrear contaminantes para dentro da sala limpa.

c) O isolador protege os operadores na manipulação dos produtos nocivos devido a barreira que existe para área de trabalho não permitindo contato direto com o produto.

d) No isolador não há necessidade de equipe de engenharia para controlar: temperatura, umidade, pressão e insuflamento de ar, esses parâmetros são controlados automaticamente. Na sala limpa é necessário suporte técnico com profissionais especializados (STEQ 2010).

1.13 Isolador de Bio-Manguinhos

Com a aquisição do isolador por Bio-Manguinhos para teste de esterilidade pelo método de filtração por membrana, houve um avanço no desempenho da metodologia e uma diminuição significativa de retestes em produtos filtráveis devido à performance do sistema. Houve redução nos gastos de material e otimização do tempo de resposta dos ensaios, além da agilidade para liberação do produto para o mercado (Santanna 2007).

A realização do teste de esterilidade dentro do isolador será um dos fatores de auditoria da ANVISA e OMS, devido às recentes normas publicadas na 5ª edição da Farmacopéia Brasileira. O equipamento isolador lotado em Bio-Manguinhos é da marca La Calhène (França) (figura 1.1) e (figura 1.2) composto por dois módulos: um módulo menor denominado de módulo de transferência, e um módulo maior, denominado de módulo de trabalho. As medidas do módulo de transferência são: largura 1950 mm, altura 2020 mm e profundidade 825 mm. A função do módulo de transferência é de esterilizar a superfície do material necessário para teste de esterilidade e evitar que haja penetração de microrganismos na área de trabalho. Esse módulo é composto por mesa e prateleiras em aço inox AISI316, envolvidos por bolha de PVC flexível. Acopladas ao PVC existem duas luvas, o que garantem o manuseio do material no interior do módulo. O PVC ao redor da bancada é sustentado externamente por armação de aço inoxidável com propriedades de suportar exposições a agentes esterilizantes e saneantes utilizados no sistema (Santanna 2007).

O sistema de ar no interior do módulo possui fluxo unidirecional vertical, em compartimento estanque equipado com meio de transferência através de túnel de

PVC onde a manipulação do material é realizada por meio de luvas (La Calhène 2000).

O segundo módulo possui tamanho maior, é denominado de módulo de trabalho “Workstation”, é neste módulo onde é realizado o teste de esterilidade pelo método de filtração, suas medidas são: largura 2440 mm, altura 2020 mm e profundidade 890 mm. É composto de mesa e prateleiras, também em aço inox AISI 316, envolvidas por PVC flexível em forma de bolha e inserido ao PVC existem duas roupas “half suit”, permitindo mobilidade dentro do módulo (STEQ 2010).

Na mesa deste módulo de trabalho está acoplada uma bomba de vácuo, denominada de steritest, da Millipore, que é responsável por auxiliar na filtração dos produtos do teste de esterilidade. O módulo de trabalho é o local onde o processo do teste de esterilidade ocorre e possui classificação de partículas em suspensão no ar classe A (STEQ 2010).

A transferência do material descontaminado do módulo de transferência para o módulo de trabalho ocorre através do túnel de PVC, onde é realizada a conexão entre os dois módulos. Esse túnel também é responsável pela passagem do material processado no teste, desta forma evita descontaminação frequente do módulo de trabalho (La Calhène 2000).



Figura 1.2 Módulo de transferência do sistema isolador conectado ao gerador de gás esterilizante e ao fundo o módulo de trabalho do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (foto capturada por Madalena de Jesus Vieira).

Para exercer a descontaminação nos módulos do isolador é necessário o auxílio do equipamento gerador de gás esterilizante, modelo Clarus C, Bioquell.

1.14 Gerador do gás esterilizante, modelo Clarus C

O gerador de gás esterilizante é um gerador de gás que opera em baixa temperatura e possui a vantagem de não deixar resíduo da biodescontaminação. Seu uso é recomendado para utilização em: salas limpas e isoladores farmacêuticos (figura 1.3). O processo de esterilização é executado automaticamente realizando biodescontaminação. O biocida utilizado neste equipamento para executar a descontaminação no sistema isolador é o peróxido de hidrogênio, fornecido pela Merck Sharp & Dohme. O peróxido de hidrogênio passa do estado líquido para estado gasoso através de um programa computacional instalado no equipamento Clarus. A conexão do Clarus C com os módulos do isolador é realizada através de mangueiras que possuem resistências de aquecimento que mantém o peróxido de hidrogênio em estado gasoso em todo percurso do Clarus até o módulo que está sendo descontaminado (Bioquell 2000). Todo o ciclo de descontaminação nos módulos é impresso em papel, o que confere ao operador rastreabilidade do ciclo da operação. O gerador de gás esterilizante possui as dimensões 511 x 938 x 727 milímetros (Bioquell 2010).



Figura 1.3 Gerador de gás de peróxido de hidrogênio Clarus C (Bioquell 2010).

A capacidade de esterilização do Clarus é de 1150 pés cúbicos de volume de ar. Sua tecnologia é compatível com a maioria dos materiais e equipamentos, possui sistema “Dual loop” que oferece eficácia no processo de descontaminação reduzindo a carga de biofilmes em 10^{-6} , que significa 1 item com microrganismo em 1.000.000 itens descontaminados. O Clarus realiza o ciclo de descontaminação através de um sistema computacional, que possui como característica principal a facilidade em operar os comandos do mesmo (Bioquell 2010).

O líquido de peróxido de hidrogênio não utilizado é coletado pelo sistema no final do ciclo, em recipiente de resíduos removível. O equipamento pode ser operado em temperatura entre -15°C a 50°C . A concentração utilizada de peróxido de hidrogênio para o processo de descontaminação no isolador é de 30% e a temperatura de abastecimento do gás na saída das mangueiras é superior a 50°C (Bioquell 2010).

1.15 Descrição do teste de esterilidade

O teste de esterilidade possui como função avaliar procedimentos assépticos de processo em indústrias farmacêuticas ou de validar um processo de esterilização. Pode ser realizado por dois métodos: por método de inoculação direta, onde o produto é inoculado diretamente em tubos contendo meios de cultura de fluido de Tioglicolato e caldo Caseína de soja, ou pelo método de inoculação indireta, também denominada de método de filtração por membrana (Farmacopéia Brasileira 2010).

No método indireto, os microrganismos presentes no produto são retidos em membrana filtrante, e após a filtração são incubados em Tioglicolato e caldo Caseína de soja. Os meios de cultura favorecem o crescimento microbiano, permitindo a verificação da presença dos microrganismos nos produtos analisados. Meios de cultura inoculados com os produtos são incubados por 14 dias nas temperaturas de $30-35^{\circ}\text{C}$ para o meio fluido de Tioglicolato e $20-25^{\circ}\text{C}$ para o meio caldo de Caseína de soja (Souto 2006).

O meio fluido de Tioglicolato é utilizado para verificar a presença de bactérias aeróbicas ou anaeróbicas e o meio de caldo Caseína de soja é utilizado para verificar a presença de bactérias aeróbicas, fungos e leveduras (Farmacopéia Brasileira 2010).

A seleção do método de esterilidade depende da natureza do produto, produtos líquidos ou solúveis em água o método de escolha é filtração por membrana, esse método teve seu emprego oficializado desde 1957 (Souto 2006).

Para produtos que não são filtráveis o método de escolha é inoculação direta, seu emprego foi oficializado desde 1932 (Souto 2006). É muito importante no método de filtração por membrana, que o sistema de filtração esteja todo estéril evitando ao máximo a presença de contaminantes nos resultados da análise. A Millipore oferece um sistema de filtração fechado, denominado steritest (Figura 1.4) onde o produto é transferido para um suporte de membrana, não havendo manipulação da membrana o que confere um caráter mais seguro ao teste (Millipore 2010). Todo procedimento no isolador deve atender as boas práticas de laboratório, fabricação e controle.



Figura 1.4 Bomba de vácuo denominada de Steritest (Millipore 2010).

1.16 Biocidas

Os biocidas surgiram na segunda guerra mundial, no século XX, na década de 1950, para facilitar a produção agrícola, eliminando organismos responsáveis por danos à plantação (Moragas e Scheider 2003).

Com o final da guerra, o uso de biocidas voltou-se para outras áreas como: química, farmácia e engenharia, devido aos conhecimentos adquiridos com relação à manipulação de substâncias químicas letais. Os biocidas puderam ser definidos como substâncias ativas ou preparações de substâncias com características diferenciadas em sua composição, com a finalidade de eliminar organismos

(Moragas e Scheider 2003). A maneira dos biocidas eliminarem os microrganismos dependerá do mecanismo de ação dos mesmos.

1.16.1 Mecanismo de ação dos biocidas

Os biocidas podem atuar sobre os microrganismos de quatro maneiras: impedindo a síntese da parede celular, impedindo a síntese de proteína, impedindo a síntese de ácidos nucleicos ou alterando as funções da membrana celular (Braoudaki e Hilton 2004).

1.16.2 Classificação dos biocidas

Os biocidas podem ser classificados segundo seu caráter químico, podendo ser biocidas oxidantes ou biocidas não oxidantes.

O mecanismo de ação dos biocidas oxidantes é a oxidação dos constituintes celulares dos microrganismos. Esse tipo de biocida possui grande poder sobre bactérias, fungos, algas e leveduras, reagindo com a matéria orgânica presente no meio ambiente, diminuindo a concentração efetiva disponível da mesma com eliminação dos microrganismos.

Exemplos de biocidas oxidantes: compostos de cloro, compostos de bromo e compostos não halogenados.

Os biocidas não oxidantes exercem sua ação interferindo no metabolismo dos microrganismos e/ ou desintegrando a parede celular dos mesmos. Necessitam ter sua aplicação em concentração elevada, uma vez que os microrganismos podem desenvolver tolerância. Essa tolerância ocorre quando o tempo de contato é relativamente longo e são utilizadas baixas concentrações na aplicação contra microrganismos.

Exemplos de biocidas não oxidantes: fenóis clorados, sais de cobre, compostos contendo mercúrio, aminas e compostos amoniacais (Caçador 2009).

1.17 Cinética microbiana

A cinética microbiana significa o estudo da curva de crescimento de um microrganismo com o aumento do número de células por intervalo de tempo. Está

diretamente relacionada com fatores como: tipo de meio de cultura, aeração, temperatura de incubação e estágio do desenvolvimento dos microrganismos.

Na curva de crescimento existe um fator importante, tempo de geração de microrganismos, que significa o intervalo de tempo necessário para que uma célula microbiana se duplique.

O crescimento de microrganismos pode ser mensurado por contagem de células viáveis, assim como, turbidimetria (medida de partículas imersas na solução por espectrofotômetro).

O cultivo celular em cultura descontínua passa por 4 fases: fase de latência ou fase lag, fase exponencial ou fase log, fase estacionária e fase de declínio ou morte (Figura 1.5) (Penna e Machoshvili 1997).



Figura 1.5 Representação gráfica de curva de crescimento em sistema fechado (Vsites 2010).

1.17.1 Fase de latência de curva de crescimento microbiano

A fase de latência (fase lag) é caracterizada por adaptação do microrganismo ao meio ambiente, é caracterizada pelo tempo necessário do microrganismo se ajustar ao novo ambiente físico-químico. Nesse período, a contagem de microrganismos não apresenta aumento de número de células. Isso ocorre devido à necessidade de síntese ou renovação de certos sistemas enzimáticos para o processamento dos nutrientes do meio de cultivo (Penna e Machoshvili 1997).

1.17.2 Fase exponencial da curva de crescimento microbiano

A fase exponencial (fase log) é caracterizada pelo aumento do número de células em ritmo constante, diretamente proporcional ao tempo de geração. Nessa fase os microrganismos se encontram em plena atividade de multiplicação celular e o suprimento de nutrientes é superior as necessidades do microrganismo. É na fase exponencial que obtemos um maior número de células microbianas viáveis (Penna e Machoshvili 1997).

1.17.3 Fase estacionária da curva de crescimento microbiano

Na fase estacionária a velocidade de crescimento dos microrganismos se torna igual à velocidade de morte dos mesmos, é nessa fase que ocorre acúmulo de metabólitos tóxicos e esgotamento de nutrientes no meio de cultura para os microrganismos semeados (Penna e Machoshvili 1997).

1.17.4 Fase de declínio ou morte na curva de crescimento microbiano

Nessa fase da curva de crescimento, o número de células viáveis decresce em ritmo constante, devido às condições desfavoráveis do meio ambiente terminando em destruição da maioria dos microrganismos (Penna e Machoshvili 1997).

1.18 Microrganismos deste estudo

Para verificar a eficácia do processo de descontaminação no sistema isolador utilizando o agente biocida peróxido de hidrogênio, a escolha de microrganismos, recaiu sobre dois tipos de bactérias: *Clostridium sporogenes* e *Micrococcus luteus* e um tipo de levedura *Candida albicans*.

No âmbito desse trabalho estudou-se a descontaminação de células viáveis representativas de contaminantes de área de laboratório. A escolha dos microrganismos utilizados no trabalho foi no sentido de representar biocarga dentro do sistema isolador. Os microrganismos contaminantes de área usados como modelo foram *Micrococcus luteus*, contaminante de área com potencial de formar biofilme (Shakeri *et al* 2005), *Candida albicans* que possui alto potencial de contaminação em áreas hospitalares (ANVISA 2000) e o microrganismo resistente a operações de descontaminação *Clostridium sporogenes*.

Para estudos laboratoriais, estes microrganismos podem ser obtidos diretamente por isolamento da água, do solo, do ar, da cavidade vaginal ou oral da mulher e do homem ou através de amostras de órgãos infectados (Serracarbassa e Dotto 2003). Também podem ser obtidos da agência americana de coleção de tipos celulares (ATCC) como, *Candida albicans* ATCC 10231 obtida de broncomiçose, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 obtido da planta do algodão, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 obtido do solo. (ATCC 2011).

1.18.1 *Candida albicans*

A *Candida albicans* é uma levedura presente na flora normal da pele do homem e dos animais. Pertence a família Saccharomycetaceae. Está presente em um menor número na cavidade oral, em número reduzido no trato gastrointestinal e muito presente no trato genital da mulher. Os métodos clássicos para detecção e identificação da *Candida albicans* são visualização ao microscópio e recuperação da levedura em meios de cultura apropriados como agar Casoy ou agar Sabouraud (Chapoux *et al* 2009).

A visualização da levedura é possível através do uso de técnicas de coloração específicas, nas quais a levedura pode ser identificada por observação microscópica direta. Entre os corantes que podem auxiliar nessa visualização destacam-se: Gram, Giemsa, prata Gomori e hidróxido de potássio. A *Candida* cresce rapidamente em quase todos os meios de cultura, mas o agar Sabouraud e o agar Casoy conseguem gerar bom crescimento em 24 horas de incubação, à temperatura entre 20-25°C.

As colônias possuem coloração branca à bege podendo apresentar duas morfologias em seu cultivo, a forma oval denominada de levedura ou a forma de tubos cilíndricos denominada de hifas. A espécie *Candida albicans* possui como característica a produção de clamidósporos (formas de resistência) (ANVISA 2000).

1.18.2 *Clostridium sporogenes*

O *Clostridium sporogenes* é uma bactéria anaeróbica, mesófila (bactérias que crescem próximas à temperatura ambiente), pertencente à família Clostridiaceae, que possui característica de não crescer em presença de oxigênio, com

classificação pela coloração de Gram, como Gram positivo, não possui mobilidade e utiliza como mecanismo de defesa, a formação de esporos.

É um microrganismo putrefativo podendo ser proteolítico que decompõem proteínas com subsequente produção de amônia e ácido sulfúrico. O habitat do *Clostridium* é o solo onde vivem em bolsas de organismos facultativos que metabolizam vários componentes orgânicos (Chapoux *et al* 2009).

1.18.3 *Micrococcus luteus*

O *Micrococcus luteus* é uma bactéria aeróbica, mesófila, com formato esférico disposto em massas irregulares, é denominado de Gram positivo segundo coloração de Gram, pertence à família Micrococcaceae, possuindo crescimento abundante em fluido de Tioglicolato e caldo Caseína de soja (meio destinado para bactéria aeróbica, fungos e leveduras). A temperatura ideal para seu cultivo é entre 30 a 35°C. É encontrado no solo, na água e até em plantas (Chapoux *et al* 2009).

O *Micrococcus luteus* é uma das bactérias que existem na água de sistemas industriais e apresenta alto potencial para formação de biofilme podendo causar sérios problemas ao sistema de água (Shakeri *et al* 2005).

1.19 Relevância do estudo

O estudo teve como propósito reduzir o tempo de descontaminação no sistema isolador de Biomanguinhos, módulo de trabalho - serie 1993, La Calhène, com o intuito de permitir o aumento no número de análises executadas por dia no equipamento.

Bio-Manguinhos está expandindo o número de produtos fabricados, por isso é importante que as análises no controle de qualidade sejam executadas com exatidão e em menor tempo possível para atender os prazos de entrega dos produtos ao mercado. O número de análises realizadas no momento dentro do isolador é de 20 lotes de produtos por dia. Com a redução no tempo de descontaminação o aproveitamento desse equipamento por dia poderá duplicar o número de análises realizadas.

O estudo também foi importante para registrar a ação do peróxido de hidrogênio nos microrganismos eleitos, que são rotineiramente manipulados em nosso laboratório, documentando assim a eficiência do mesmo.

Com a redução no tempo de descontaminação do módulo de trabalho irá haver redução no gasto de energia por parte do equipamento e aproveitamento do homem hora por jornada de trabalho.

O conhecimento do poder biocida do peróxido de hidrogênio dentro do sistema isolador será crucial para as atividades da seção Esterilidade de Processos e Insumos, confirmando assim, por metodologia padronizada, a eficácia do processo de descontaminação do módulo de trabalho do isolador, gerando maior confiabilidade nos testes de esterilidade e preconizando a definição de um ciclo de descontaminação no isolador de Bio-Manguinhos, otimizado desta forma para duas horas ao invés de quatro horas como preconizado atualmente, o que contribui de forma significativa para reduzir o tempo nas análises efetuadas.

Também foi possível através das curvas de crescimento do estudo, obter o conhecimento da cinética de crescimento de todos os microrganismos eleitos, registrando assim, informações úteis para futuros experimentos no Departamento de Qualidade de Bio-Manguinhos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi verificar o processo de descontaminação, em tempo reduzido no sistema isolador utilizando como agente biocida o peróxido de hidrogênio.

2.2 Objetivos específicos

a) Conhecer a cinética de crescimento dos microrganismos, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes* e *Micrococcus luteus*.

b) Estabelecer a relação da absorvância dos microrganismos do estudo com a quantidade de células viáveis.

c) Verificar a ação do biocida peróxido de hidrogênio frente a três concentrações dos microrganismos: *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes* e *Micrococcus luteus* dentro do sistema isolador.

d) Otimizar o tempo de descontaminação dentro do sistema isolador para dez minutos.

e) Estabelecer a capacidade de descontaminação dentro do sistema isolador avaliando a carga microbiana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os principais materiais e as metodologias utilizadas para estudo da cinética de crescimento dos microrganismos: *Candida albicans* ATCC10231, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 e *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e a metodologia utilizada para desafio e confirmação da eficácia do processo de descontaminação no isolador.

Através da cinética de crescimento foi possível relacionar absorvância da suspensão microbiana com número de células viáveis, fator importante para conhecermos a quantidade de microrganismos que o processo de descontaminação no isolador é capaz de eliminar.

3.1 Microrganismos

3.1.1 *Candida albicans*

Todas as cepas utilizadas neste estudo foram cedidas pela seção de Esterilidade Processos e Insumos (SEPIN) do Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos, em tubos criogênicos contendo 1 mL de suspensão de trabalho (lote de trabalho), preparadas para teste de promoção de crescimento de meios de cultura.

A cepa de *Candida albicans* é comercializada liofilizada impregnada em alças plásticas, na concentração de 100 unidades formadoras de colônias (UFC) em 0,1 mL (nome comercial dessa preparação “culti loops”). Sendo reidratadas pelo SEPIN seguindo Instrução de Trabalho (IT) nº 0646 do Departamento de Qualidade DEQUA/Bio-Manguinhos, para preparo de suspensão de trabalho com 20% de glicerol, distribuída em tubos criogênicos e armazenada em câmara fria na temperatura de – 20°C.

3.1.2 *Clostridium sporogenes*

A cepa de *Clostridium sporogenes* também foi adquirida através do SEPIN na forma de suspensão de trabalho (lote de trabalho) em tubos criogênicos armazenados em câmara fria na temperatura de – 20°C.

Essa cepa é comercializada liofilizada, impregnada em alças plásticas, na concentração de 100 UFC em 0,3 mL (nome comercial da preparação “quanti loops”) sendo no SEPIN reidratada para preparar suspensão de trabalho com 20% de glicerol, seguindo a IT nº0646 do DEQUA.

Os esporos de *Clostridium sporogenes*, para serem utilizados no isolador, foram adquiridos através do estudo da cinética de crescimento do microrganismo onde foi selecionada a suspensão no 24º tempo da curva, com maior número de esporos em relação às suspensões dos outros tempos do crescimento.

A média de esporos encontrada foi de 100 esporos em cada 4 campos observados dos esfregaços em lâminas coradas pela coloração de Gram.

3.1.3 *Micrococcus luteus*

A cepa de *Micrococcus luteus*, assim como as demais cepas utilizadas nesse estudo também estava em tubos criogênicos armazenados na forma de suspensão de trabalho (lote de trabalho) em câmara fria na temperatura de – 20°C.

Esta cepa, assim como as demais cepas do estudo, é comercializada liofilizada impregnada em alças plásticas na concentração de 100 UFC em 0,1 mL (nome comercial “culti loops”), sendo reidratadas no SEPIN seguindo IT nº 0646 do DEQUA, para confecção de suspensão de trabalho com 20% de glicerol.

3.2 Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados nos experimentos foram previamente testados para esterilidade e fertilidade, sendo aprovados para uso.

3.2.1 Meios de cultura utilizados para *Candida albicans*

Foram utilizados nos experimentos com a levedura *Candida albicans* os meios de cultura sólidos: agar TSNI utilizado para contagem de células viáveis (placas de Petri de tamanho 90 por 15 milímetros contendo agar triptona de soja com neutralizante, esterilizadas por raios gama, Biolab Mérieux) e o agar sangue para verificação da pureza da suspensão de leveduras (placa de Petri de tamanho 90 por 15 milímetros, BIOCEN,USA).

Como meios líquidos foram utilizados: caldo Caseína de soja como diluente da suspensão de leveduras (TSB–“Triptic soy broth”,Biolab Mérieux, frascos contendo 100 mL de meio) e caldo Caseína de soja (“Bacto Tryptic Soy Broth”,Becton Dickinson, França) para verificação da presença de células viáveis após o processo de descontaminação no isolador, comercializado na forma liofilizada sendo ressuspendido pela seção SEMEC na concentração de 30 gramas para 1 litro de água purificada, seguindo IT nº 0177, distribuído em tubos de 24 centímetros contendo 100 mL do meio.

Na tabela 3.1 estão listados os componentes do meio e suas concentrações segundo o fabricante Becton Dickinson.

Tabela 3.1 Composição do meio de cultura caldo caseína (“Bacto Tryptic Soy Broth”, Becton Dickinson, França).

Componentes	Concentração (g)/L
Digestão pancreática de caseína	17
Digestão enzimática de alimento de soja	3,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de potássio bifásico	2,5

3.2.2 Meios de cultura utilizados para *Clostridium sporogenes*

Foram utilizados nos experimentos com a bactéria anaeróbica *Clostridium sporogenes* os meios de cultura sólidos: agar nutriente para contagem de células viáveis (placas de Petri de tamanho 90 por 15 milímetros, BIOCEN,USA) e agar sangue para verificação da pureza da suspensão bacteriana (placas de Petri de tamanho 90 por 15 milímetros, BIOCEN,USA).

Como meios de cultura líquidos foram utilizados: fluido Tioglicolato (“Fluid Thioglycollate Medium, Becton Dickinson, França), meio de cultura para curva de crescimento, comercializado na forma liofilizada, sendo ressuspendido pela seção

SEMEC, na concentração de 29,8 g para 1 litro de água purificada, seguindo IT nº 0177, distribuído em tubos de 20 centímetros de comprimento com 18 mL de meio de cultura. Na tabela 3.2 estão listados os componentes do meio e suas concentrações segundo o fabricante Becton Dickinson.

Tabela 3.2 Composição do meio de cultura Tioglicolato ("Fluid Thioglycollate Medium", Becton Dickinson, França).

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona de caseína	15
Extrato de levedura	5,0
D (-) glucose	5,5
L-cystina	0,5
Cloreto de sódio	2,5
Tioglicolato sodio	0,5
Resazurina sódica	0,001
Agar Agar	0,75

E caldo BHI - "Brain Heart Infusion" (infusão de coração e cérebro de boi), comercializado liofilizado sendo ressuspendido pela seção SEMEC na concentração de 52 g para 1 litro de água desmineralizada, distribuído em frascos com capacidade para 100 mL contendo 75 mL de meio de cultura, seguindo IT nº 0177. Utilizado no estudo como diluente da suspensão bacteriana. Na tabela 3.3 estão listados os componentes do meio "Brain Heart Infusion" segundo o fabricante Merck, Germany.

Tabela 3.3 Composição do meio de cultura caldo BHI ("Brain Heart Infusion", Merck, Alemanha).

Componentes	Concentração (g/L)
Infusão de cérebros de novilhos	7,7
Infusão de coração	9,8
Proteose peptona	10
Dextrose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de sódio bifásico	2,5

3.2.3 Meios de cultura utilizados para *Micrococcus luteus*

Foram utilizados nos experimentos com a bactéria aeróbica *Micrococcus luteus*, os meios de cultura sólidos: agar nutriente para contagem de células viáveis (placas de Petri de tamanho 90 por 15 milímetros, BIOGEN,USA) e agar sangue para verificação da pureza da suspensão bacteriana (placas de Petri tamanho 90 por 15 milímetros, BIOGEN,USA).

Como meios líquidos foram utilizados: caldo BHI - "Brain Heart Infusion", Merck, preparado pela seção SEMEC, o preparo seguiu a mesma proporção quando utilizado para *Clostridium sporogenes* segundo IT nº 0177, frascos com 75 mL de meio. E também foi utilizado o fluido Tioglicolato - "Fluid Thioglycollate Medium", Becton Dickinson, França, tubos de 24 centímetros contendo 100 mL do meio, preparados pela seção SEMEC segundo IT nº 0177, para verificação de presença de células viáveis após descontaminação no isolador.

Todos os meios de cultura preparados na seção SEMEC após a distribuição nos devidos recipientes foram submetidos à autoclavação a 121 °C por 15 minutos.

3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados no estudo foram: peróxido de hidrogênio, H₂O₂, marca Merck (nº 1.07210.1000) a 30 %, como agente biocida, e a solução de glicerol a 10 % preparado "in house" como crioprotetor, (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 Composição do Glicerol a 10% preparado "in house".

Componentes	Concentração (mL)
Glicerol P.A	190
Água purificada	10

3.4 Cinética de crescimento

As curvas de crescimento de todos os experimentos, inclusive as padrões (de referência) para nosso estudo foram realizadas em triplicatas utilizando quatro concentrações das culturas puras (suspensão concentrada, suspensão diluída 1:2, suspensão diluída 1:4 e suspensão diluída 1:8). As diluições foram realizadas de forma serial com meio de cultura específico para cada microrganismo, em tubos com capacidade de 20 mL e volume final de 10 mL, com o intuito de padronizar o

parâmetro cinético (absorvância) utilizado no desafio do isolador. Os procedimentos seguiram as boas práticas de laboratório.

3.4.1 Curva de crescimento da *Candida albicans*

A curva de crescimento para a levedura *Candida albicans* foi realizada após descongelamento da suspensão matriz à temperatura de 25°C por 15 minutos. Logo após o descongelamento a suspensão foi homogeneizada e semeada em 9 placas de Petri contendo agar TSNI e 1 placa de Petri contendo agar sangue (para verificação da pureza da suspensão matriz), utilizando volume por placa de 0,1 mL. As placas com meio TSNI foram incubadas à temperatura de 25°C, em câmara climatizadora (FANEM) por 24 horas e a placa de agar sangue foi incubada à temperatura de 33°C também em câmara climatizadora (FANEM), pelo mesmo período de incubação, 24 horas.

Após esse processo em um fluxo laminar, duas colônias de uma das placas de TSNI foram escolhidas aleatoriamente e submetidas à coloração de Gram para certificação da morfologia da *Candida albicans* e a placa contendo agar sangue foi investigada com visualização em estereomicroscópio para observação da pureza da suspensão, sendo encaminhada após observação para autoclavação e descarte.

As colônias das 8 placas restantes de TSNI foram reconstituídas com 2 mL de caldo TSB, com auxílio de pipetas estéreis e alça de Drigalski, e com o volume total foi realizada uma mistura transferida para tubo de centrifugação, para homogeneização. Dessa mistura foram retiradas duas alíquotas de 50µL para serem inoculadas em dois erlenmeyers contendo 100 mL de caldo TSB, com capacidade para 500 mL cada, que serviram para realização da curva de crescimento em duplicata.

Uma alíquota de 2 mL foi retirada de cada um dos erlenmeyers logo no início da curva de crescimento, para monitoramento da curva no tempo zero.

Uma parte da alíquota retirada serviu para leitura da absorvância em espectrofotômetro (Hitachi) no comprimento de onda de 660 nanômetros e a outra parte serviu para diluições seriadas decimais de 10^{-1} à 10^{-10} com plaqueamento das suspensões diluídas em placas de Petri contendo agar TSNI. As placas foram incubadas em câmara incubadora (FANEM) à temperatura de 25°C por 24 horas, com posterior contagem das células viáveis.

Os erlenmeyers com meio de cultura e a suspensão microbiana, foram incubados com rolhas estéreis sob agitação de 100 rpm (rotação por minuto) à temperatura de 25°C, durante 6 horas.

A cada hora da curva foi realizada leitura de absorvância da suspensão microbiana, no comprimento de onda 660nm e nas horas pares também foi realizado plaqueamento por esgotamento das diluições seriadas decimais da suspensão, com incubação das placas à temperatura de 25°C por 24 horas, para posterior contagem das células viáveis.

O procedimento se repetiu por três vezes em dias diferentes seguindo as boas práticas de laboratório e boas práticas de fabricação.

3.4.2 Curva de crescimento do *Micrococcus luteus*

A curva de crescimento para a bactéria aeróbica *Micrococcus luteus* foi realizada também com descongelamento de um tubo criogênico contendo suspensão de *Micrococcus luteus* à temperatura ambiente com posterior homogeneização. Logo após a homogeneização, a suspensão foi semeada em 9 placas de Petri contendo agar nutriente e uma placa de Petri contendo agar sangue (nesse caso para confirmação da pureza das colônias), utilizando volume por placa igual a 0,1 mL. O procedimento foi realizado em fluxo laminar seguindo as normas de boas práticas de laboratório e boas práticas de fabricação.

As placas foram incubadas em câmara climatizadora (FANEM)), por 24 horas à temperatura de 33°C. Após o período de incubação, em um fluxo laminar, foi realizado o mesmo procedimento que na curva de crescimento da *Candida albicans*, no qual duas colônias de uma das placas de agar nutriente foram escolhidas aleatoriamente e submetidas à coloração de Gram para certificação da morfologia e a placa contendo agar sangue foi investigada para observação da pureza da suspensão.

As colônias das 8 placas restantes de agar nutriente foram ressuspendidas com 2 mL de caldo BHI, com auxílio de pipetas estéreis e alças de Drigalski. Com o volume total foi realizada mistura, transferida para tubo de centrifugação para homogeneização. Dessa mistura foram retiradas duas alíquotas de 50 µL para serem depositadas em dois erlenmeyers contendo 100 mL de caldo BHI em cada, que serviram para realização da cinética de crescimento.

Uma alíquota de 2 mL foi retirada de cada um dos erlenmeyers no início do processo. Com 1 mL de cada alíquota foram realizadas diluições seriadas decimais, de 10^{-1} a 10^{-10} . As diluições foram semeadas em placas de Petri contendo agar nutriente, com incubação à temperatura de 33°C por 24 horas. Após esse período foi realizada a contagem de células viáveis.

Com o volume restante da alíquota de suspensão retirada de cada um dos erlenmeyers foi realizada leitura de absorvância da suspensão em espectrofotômetro, (Hitachi), no comprimento de onda de 660 nm.

Os erlenmeyers foram incubados à temperatura de 33°C sob agitação de 120 rpm (rotação por minuto) em câmara climatizadora (FANEM), durante 6 horas. A cada hora era realizada leitura da absorvância da suspensão à 660nm e nas horas pares também eram realizadas diluições seriadas decimais com plaqueamento. As placas foram incubadas em temperatura de 33°C por 24 horas. O procedimento da curva de crescimento de *Micrococcus luteus* também se repetiu por três vezes em dias diferentes, seguindo as normas de boas práticas de laboratório e boas práticas de fabricação.

3.4.3 Curva de crescimento do *Clostridium sporogenes*

A curva de crescimento para a bactéria anaeróbica *Clostridium sporogenes* foi realizada da mesma maneira que para os demais microrganismos do estudo, com descongelamento de 1 tubo criogênico com suspensão matriz e homogeneização com semeadura em 9 placas de Petri contendo agar nutriente e 1 placa de Petri contendo agar sangue, para confirmação da pureza das colônias, utilizando volume de 0,1 mL por placa. Esse procedimento foi realizado em fluxo laminar, seguindo as normas de boas práticas de laboratório e boas práticas de fabricação.

As placas foram colocadas em jarra de anaerobiose e a jarra foi incubada em câmara climatizadora, por 48 horas à temperatura de 33°C. Após o período de incubação o procedimento para verificação das colônias foi o mesmo que utilizado para outros microrganismos do estudo, assim como a verificação da pureza da suspensão.

As colônias das 8 placas restantes de agar nutriente foram ressuspendidas com 2 mL de caldo BHI. Com o volume total foi realizada mistura, transferida para tubo de centrifugação para homogeneização. Dessa mistura foram retiradas

alíquotas de 50 µL para serem depositadas em cada um dos 12 tubos de meio fluido de Tioglicolato contendo 18 mL de meio de cultura.

Foi utilizado esse quantitativo de tubos para que na hora da coleta dos volumes da suspensão para monitoramento da curva, o oxigênio do ambiente não interferisse na cinética de crescimento.

Uma alíquota de 2 mL foi retirada de dois tubos de meio fluido de Tioglicolato. Com metade das alíquotas foram realizadas leituras de absorvância das suspensões em espectrofotômetro (Shimatsu UV 1213), no comprimento de onda de 660 nm, o próprio meio de cultura foi utilizado como branco na leitura do espectrofotômetro, para que a coloração parda da suspensão não influenciasse nas leituras, com as partes restantes foram realizadas diluições seriadas decimais de 10^{-1} a 10^{-10} com plaqueamento para contagem de células viáveis. Foi semeado um volume de 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo agar nutriente e as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, à temperatura de 33°C por 48 horas, com posterior contagem de células viáveis.

Os demais tubos inoculados com a suspensão permaneceram na câmara incubadora sem agitação. E nos horários referentes a 12, 24, 36, 48 e 60 horas do cultivo eram retirados 2 tubos de fluido de Tioglicolato, para monitoramento da curva com leitura da absorvância da suspensão em 660 nm e plaqueamento igual ao utilizado no primeiro momento da curva. O procedimento da curva de crescimento foi repetido três vezes em dias diferentes.

3.5 Curva padrão

Foram utilizadas curvas de referência, denominadas neste estudo como curva de crescimento padrão, para avaliação das curvas de crescimento dos microrganismos do estudo. As curvas padrão dos microrganismos foram realizadas por média de quatro concentrações diferentes das suspensões matriz.

As suspensões matriz (de cada microrganismo) foram submetidas às diluições: 1:2, 1:4 e 1:8. Na diluição 1:2, foram adicionados 5 mL da suspensão matriz em 5 mL de meio de cultura como diluente, para cada microrganismo foi utilizado meio de cultura específico. Na diluição 1:4, foram retirados 5 mL da diluição 1:2 e adicionados em 5 mL do diluente e na diluição 1:8, foram retirados 5 mL da diluição 1:4 e adicionados em 5 mL do diluente. Após a diluição a metodologia utilizada nas

curvas padrão dos microrganismos seguiu da mesma forma que a metodologia utilizada nas curvas testes dos microrganismos do estudo. O monitoramento da curva padrão ocorreu da mesma maneira que o realizado para curva teste por observação de absorvância da suspensão no decorrer da curva de crescimento, assim como, contagem de células viáveis obtidas por plaqueamento.

3.6 Amostras para desafio no isolador

A coleta das suspensões de *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes* e *Micrococcus luteus* para serem utilizadas no desafio da descontaminação do sistema isolador, ocorreu na fase log da curva de crescimento, de cada microrganismo, com maior número de células viáveis presentes.

As suspensões foram aliqüotadas em volume de 800 µL para tubos criogênicos com 200 µL de glicerol a 10 % e submetidas a congelamento à -20°C até a realização do teste no isolador, o intervalo de tempo até a utilização no desafio do isolador foi de 7 dias.

3.7 Preparo das suspensões para ensaio de desafio

Os microrganismos foram utilizados no isolador em três concentrações diferentes de suspensões: suspensão pura ou concentrada, suspensão diluída 1:2 e suspensão diluída 1:4.

As diluições das suspensões dos microrganismos foram realizadas em fluxo laminar vertical onde foram descongelados dois tubos criogênicos, à temperatura de 25°C por 15 minutos, para cada microrganismo. Um tubo foi utilizado para representar a suspensão concentrada e o outro tubo foi utilizado para as diluições 1:2 e 1:4. Na diluição 1:2 foram retirados 600 µL da suspensão concentrada e adicionados em 600 µL de meio de cultura diluente (para *Candida albicans* o meio de cultura diluente utilizado foi caldo TSB, para *Clostridium sporogenes* e *Micrococcus luteus* o meio de cultura diluente foi o caldo BHI). Na diluição 1:4 foram retirados 500 µL da diluição 1:2 e adicionados a 500 µL do meio de cultura diluente.

3.8 Inóculo dos microrganismos nos papéis de filtro

Após o preparo das diluições, foram retirados 200 µL de cada concentração e adicionados em discos de papéis de filtro estéreis, de gramatura de 250 gramas com 4,5 centímetros de diâmetro e como suporte dos papéis de filtro foram utilizadas placas de Petri de 5 centímetro de diâmetro.

Os papéis de filtro contaminados com suspensão concentrada de *Candida albicans* tiveram número médio de células viáveis igual a $4,2 \times 10^7$ UFC/mL, papéis contaminados com diluição 1:2 tiveram média de células viáveis igual a $2,23 \times 10^7$ UFC/mL e papéis contaminados com diluição 1:4 da suspensão tiveram média de células viáveis igual a $1,6 \times 10^6$ UFC/mL.

Para *Micrococcus luteus* os papéis de filtro contaminados com a suspensão concentrada tiveram média de número de células viáveis em torno de $1,9 \times 10^8$ UFC/mL, papéis contaminados com diluição 1:2 da suspensão tiveram média de $5,7 \times 10^7$ UFC/mL e papéis contaminados com diluição 1:4 da suspensão tiveram média de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL. No caso do *Clostridium sporogenes* o número médio de células viáveis nos papéis contaminados com a suspensão concentrada foi de $2,6 \times 10^7$ UFC/mL, para papéis contaminados com a diluição 1:2 o número médio de células viáveis foi de $7,3 \times 10^6$ UFC/mL e para papéis contaminados com diluição 1:8 a média de número de células viáveis foi de $6,7 \times 10^6$ UFC/mL.

Paralelamente outros papéis de filtro foram contaminados com as diluições 1:4 dos microrganismos, para servirem de controles positivos no teste de eficácia da descontaminação e mantidos no fluxo laminar até a realização do teste de eficácia do processo de descontaminação no isolador.

3.9 Desafio do processo de descontaminação no isolador

As placas de Petri contendo os papéis de filtro contaminados com as suspensões foram transportadas para dentro do módulo de trabalho do isolador (serie 1993) em caixa de inox e colocadas emparelhadas de acordo com as diluições correspondentes, no meio da bancada do módulo. Após fechamento da porta lateral do isolador, as placas foram abertas para que os microrganismos pudessem entrar em contato com o vapor de peróxido de hidrogênio fornecido pelo gerador de gás de peróxido de hidrogênio, Clarus C (Bioquell), acoplado ao módulo a ser descontaminado.

O processo de descontaminação do módulo de trabalho do isolador foi realizado em 5 fases conforme procedimento padrão com auxílio do gerador do gás de peróxido de hidrogênio, que executou a biodescontaminação através de programa computacional.

São gastas +/- 4 horas para que o processo da biodescontaminação seja concluído no isolador. No caso deste estudo, a quarta fase do processo de descontaminação, foi alterada para ter duração de 10 minutos, com base na biossegurança do processo, o preconizado pelo fabricante são 30 minutos, esse tempo reduzido teve o intuito de desafiar a ação do peróxido de hidrogênio em menor tempo de exposição do gás dentro do isolador.

Na primeira fase do ciclo foi verificada a estanqueidade do equipamento, com insuflamento do ar até a pressão de 100 Pascal, retornando, após 5 minutos, para pressão de trabalho de 50 Pascal. Na segunda fase, foi verificada a taxa de umidade dentro do módulo a ser descontaminado que não ultrapassou de 40%, recomendação do fabricante (La Calhène, França). Essa percentagem de umidade é estabelecida para que o ambiente impeça a proliferação de fungos e leveduras, segundo o manual da Bioquell revisão 8. A terceira fase foi iniciada com injeção do gás de peróxido de hidrogênio a uma concentração de 2,5 gramas por minuto, tempo de duração dessa etapa 20 minutos. E na quarta fase, ocorreu a descontaminação do sistema propriamente dito, na qual a concentração do gás foi de 5 g por minuto, tempo gasto nessa fase de 10 minutos. Na última fase, ocorreu à aeração, retirando do sistema, todo excesso de peróxido de hidrogênio. Devido o tempo para descontaminação do isolador ter sido reduzido para 10 minutos, conseqüentemente o tempo de aeração não ultrapassou de 2 horas.

Ao término da etapa de aeração, as placas foram fechadas e colocadas na caixa de inox. A concentração interna do peróxido de hidrogênio foi verificada através: do programa computacional do gerador de gás esterilizante, e de ampolas comerciais, contendo substância de iodeto de potássio que reage com o peróxido de hidrogênio formando a cor marrom, que na ampola através da tabela impressa no vidro é permitido visualizar a concentração do gás. Logo após a confirmação de concentração de peróxido de hidrogênio abaixo de 2 ppm, as placas foram transportadas até o fluxo laminar onde foi processado o teste de avaliação da eficácia da descontaminação.

3.10 Avaliação da eficácia do processo de descontaminação no isolador

A eficácia do processo de descontaminação no sistema isolador ocorreu com a verificação de presença de células viáveis nos papéis de filtro com suspensões microbianas, submetidas ao processo no isolador. Foram transferidos os papéis de filtro para tubos contendo 100 mL de meio de cultura, sob fluxo laminar.

Os tubos foram incubados em temperatura própria para cada microrganismo inoculado e o tempo gasto na observação dos tubos foi de 10 dias.

Para discos contendo suspensões de *Candida albicans* foram utilizados tubos de meio de cultura de caldo Caseína de soja no volume de 100 mL e a temperatura de incubação foi de 23°C, para os papéis de filtro contendo suspensões de *Micrococcus luteus* e *Clostridium sporogenes* os tubos de meio de cultura utilizados foram fluido Tioglicolato, no volume de 100 mL e a temperatura de incubação foi 33°C.

Também foram transferidos para tubos com meios de cultura os papéis de filtro contaminados com as suspensões microbianas (na diluição 1:4), que não foram submetidas ao processo de descontaminação, no intuito de servirem de controle positivo. E para controle negativo foram utilizados dois papéis de filtro estéreis, um deles transferido para tubo de fluido Tioglicolato e o outro transferido para tubo de caldo caseína de soja.

3.11 Roteiro experimental

O roteiro experimental do estudo foi dividido em três etapas devido questões logísticas. A primeira etapa foi realizada no Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) e no Laboratório Físico – Químico (LAFIQ) utilizando o espectrofotômetro (Hitachi modelo U 5.100) para leitura da absorvância em 660 nm. Nessa etapa foram realizadas as curvas de crescimento: de *Candida albicans* e do *Micrococcus luteus* (Figura 3.1). A segunda etapa foi realizada nos laboratórios LACOM e o Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) para realização da curva de crescimento do *Clostridium sporogenes* onde foram realizadas as leituras de absorvância no espectrofotômetro (Shimatsu modelo UV1213), em comprimento de onda de 660 nm, (Figura 3.1) e a terceira etapa foi desenvolvida na seção de Esterilidade Processos e Insumos (SEPIN), onde foram realizados os desafios do processo de

descontaminação no sistema isolador e confirmação da eficácia do agente biocida, peróxido de hidrogênio (Figura 3.2).

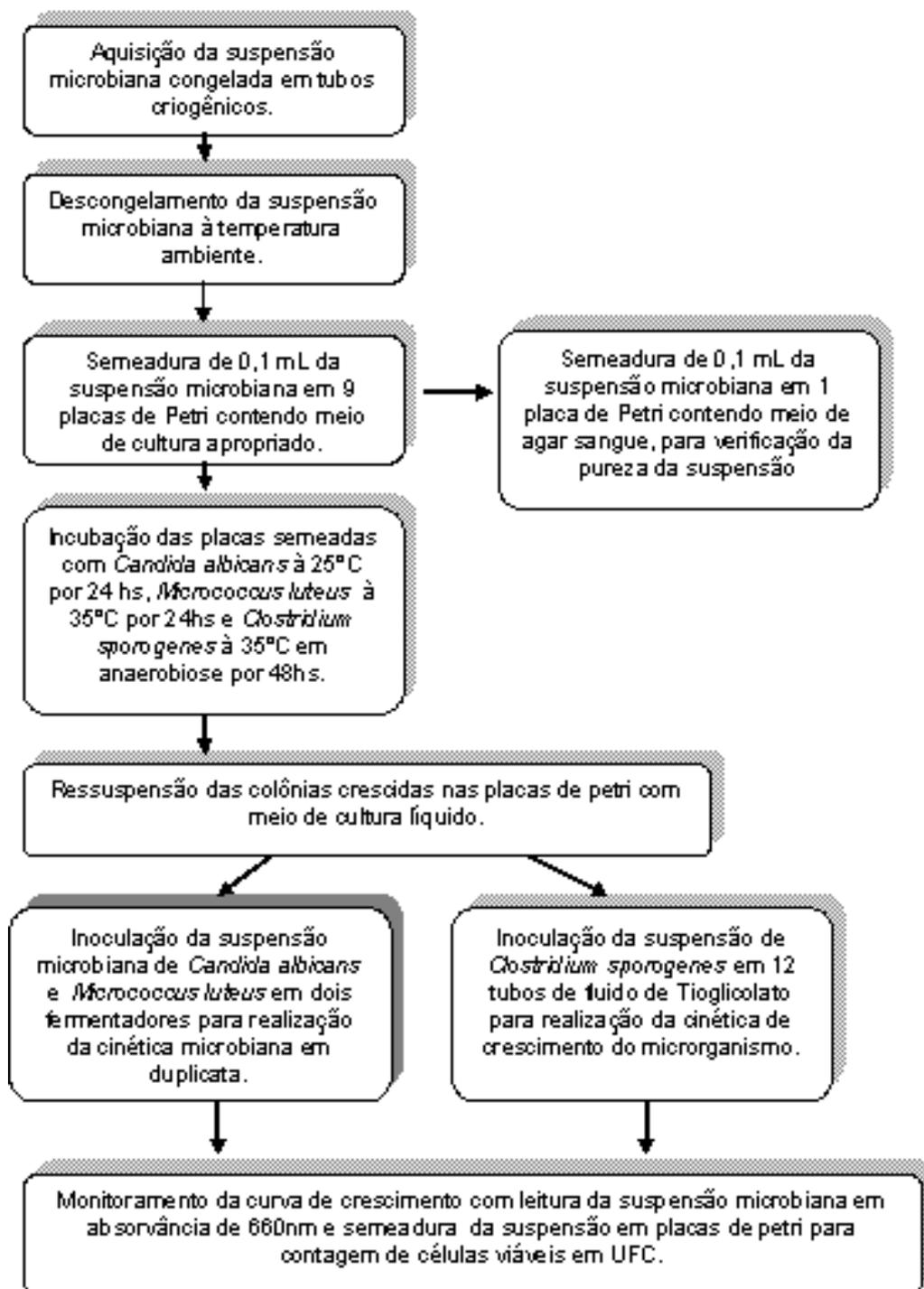


Figura 3.1 Primeira e segunda etapas dos experimentos.

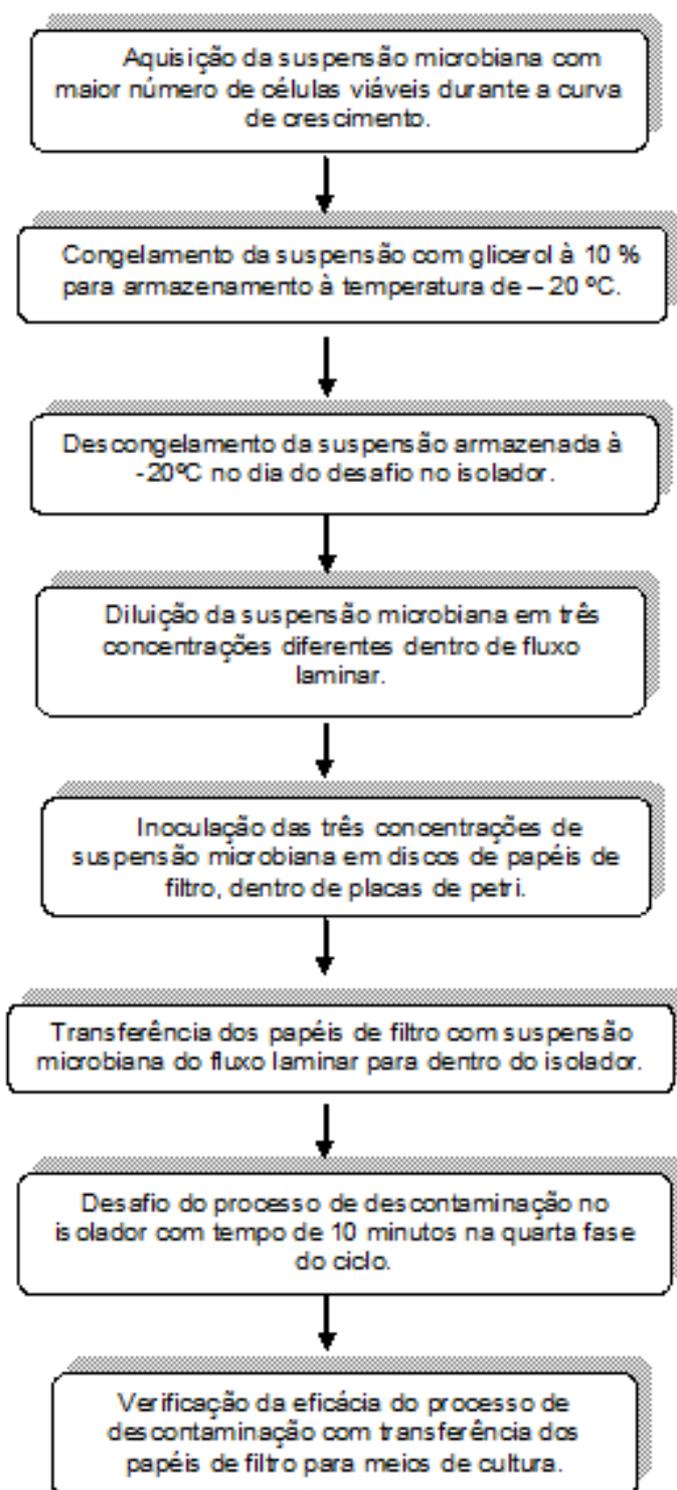


Figura 3.2 Terceira etapa do experimento.

4 RESULTADOS

O estudo foi dividido em duas etapas, na primeira foram obtidos os resultados referentes às curvas de crescimento dos microrganismos: *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes* e *Micrococcus luteus* com monitoramento das curvas através dos parâmetros cinéticos de absorvância e contagem de células viáveis, com relação ao tempo, para produção das suspensões microbianas com maior número de células viáveis a serem utilizadas no desafio do isolador. E na segunda etapa foram realizados os desafios do processo de descontaminação no isolador utilizando biocargas das suspensões microbianas.

4.1 Resultados da cinética de crescimento da *Candida albicans*

O estudo da cinética de crescimento da *Candida albicans* foi monitorado por um período de tempo de até 6 horas e os resultados encontrados da leitura de absorvância e número de células viáveis das curvas teste e curva padrão estão representados na tabela 4.1. Os valores das médias de absorvância e o desvio padrão estão representados na figura 4.1 e os valores relativos da média de UFC com relação ao tempo em hora estão representados na figura 4.2.

As suspensões dos inóculos de *Candida albicans* plaqueadas em meio sólido (placas de Petri), de diferentes tempos da curva foram observados com crescimento característico e abundante, até a diluição de contagem de colônias o mesmo ocorreu na curva padrão.

Tabela 4.1 Resultados da cinética de crescimento, teste e padrão, de *Candida albicans*.

Tempo (hora)	Absorvância (660 nm)		UFC/mL	
	Teste	Padrão	Teste	Padrão
0	0,030	0,060	$3,90 \times 10^5$	$5,73 \times 10^5$
1	0,036	0,064	-	-
2	0,049	0,108	$5,1 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$

3	0,078	0,126	-	-
4	0,109	0,145	$6,67 \times 10^5$	$9,64 \times 10^5$
5	0,155	0,257	-	-
6	0,239	0,395	$12,4 \times 10^5$	$24,5 \times 10^5$

Os valores representam a média de três experimentos independentes para curva teste e para curva padrão.

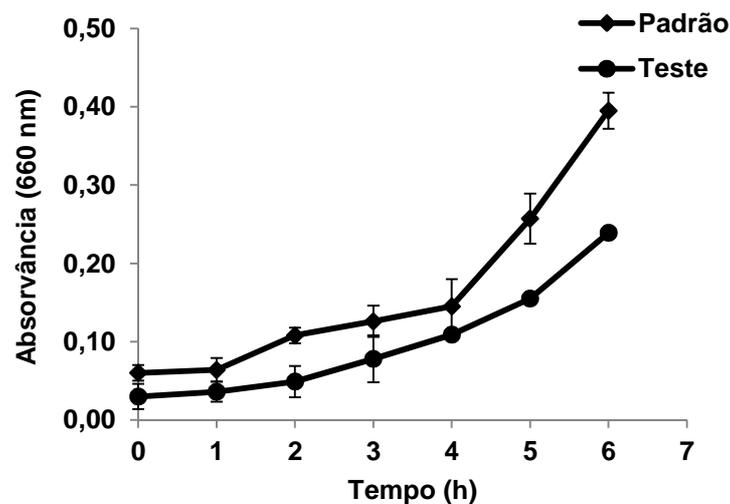


Figura 4.1 Cinética de crescimento, teste e padrão, da *Candida albicans*, com monitoramento por absorvância em 660 nm com relação ao tempo em hora.

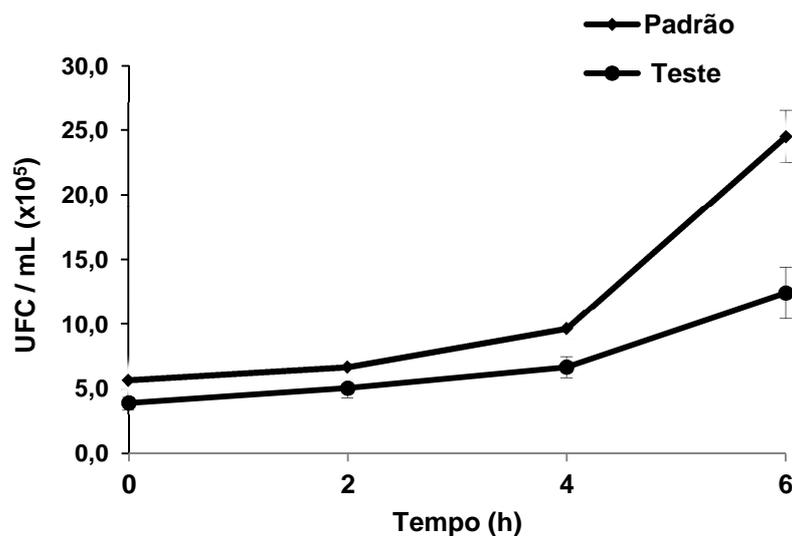


Figura 4.2 Cinética de crescimento, teste e padrão, da *Candida albicans* com monitoramento por UFC com relação ao tempo em hora.

A *Candida albicans* apresentou fase lag nas primeiras duas horas da curva de crescimento, seguindo de fase exponencial com aumento de velocidade de geração

a partir do quarto horário, chegando ao sexto horário da curva com maior número de células viáveis observados nesse estudo.

Foi possível relacionar os valores de absorvância da suspensão com as médias de células viáveis ao longo da curva de crescimento, durante as 6 horas de observação.

4.2 Resultados da cinética de crescimento do *Micrococcus luteus*

O estudo da cinética de crescimento do *Micrococcus luteus* foi monitorado por período de tempo igual a *Candida albicans*, com 6 horas de cultivo e os resultados encontrados estão representados na tabela 4.2. Os valores das médias de absorvância e do desvio padrão com relação ao tempo em horas estão representados na figura 4.3 e os valores relativos à UFC com relação ao tempo em horas estão representados na figura 4.4.

Tabela 4.2 Resultados da cinética de crescimento da bactéria aeróbica *Micrococcus luteus*

Tempo (hora)	Absorvância (660 nm)		UFC/mL	
	Teste	Padrão	Teste	Padrão
0	0,097	0,086	$3,83 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
1	0,115	0,090		
2	0,149	0,132	$6,15 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
3	0,235	0,147		
4	0,402	0,299	19×10^6	$6,4 \times 10^6$
5	0,612	0,483		
6	1,140	0,508	50×10^6	30×10^6

Os valores representam a média de três experimentos independentes.

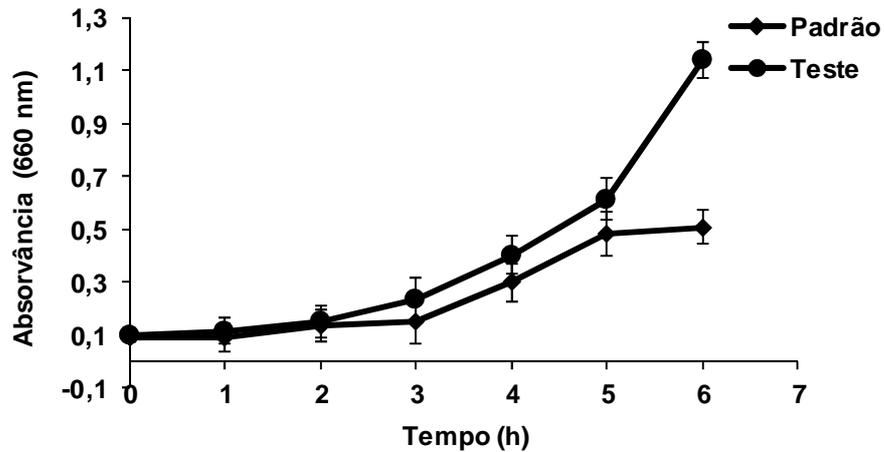


Figura 4.3 Cinética de crescimento, teste e padrão, do *Micrococcus luteus* com monitoramento por absorvância de 660 nm com relação ao tempo em hora.

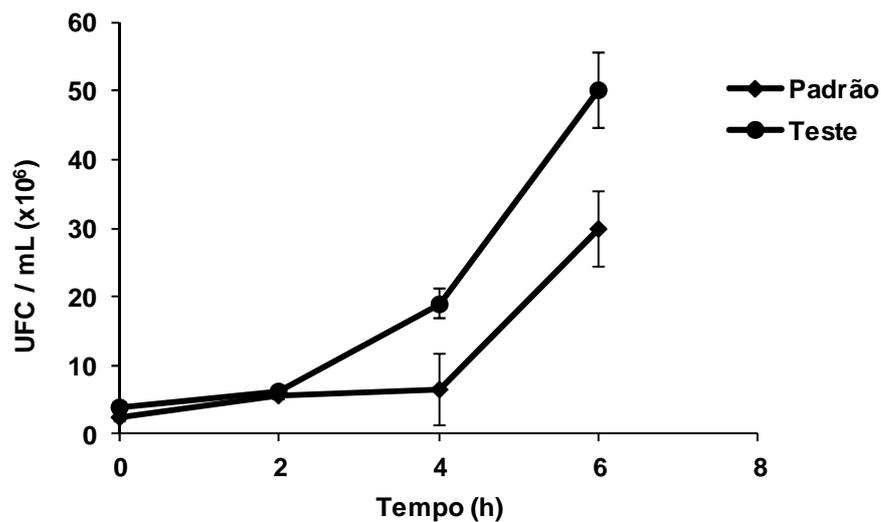


Figura 4.4 Cinética de crescimento, teste e padrão, do *Micrococcus luteus* com monitoramento por UFC, com relação ao tempo em hora.

Na curva de crescimento do *Micrococcus luteus* também foi possível observar que a fase lag ocorreu nas primeiras duas horas, seguido de fase exponencial até a sexta hora. Houve aumento da velocidade de geração também a partir do quarto horário assim como ocorreu na curva de crescimento da *Candida albicans*. Os valores crescentes de absorvância coincidiram com as médias crescentes dos números de células viáveis. O que também tornou possível quantificar aproximadamente a suspensão de *Micrococcus luteus* a partir da absorvância encontrada.

4.3 Resultados da cinética de crescimento do *Clostridium sporogenes*

A bactéria *Clostridium sporogenes* por ser anaeróbica teve seu crescimento de forma mais lento. O monitoramento da cinética de crescimento ocorreu por absorvância em 660 nm e contagem de células viáveis, com observações efetuadas nos tempos, 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas após cultivo.

Os resultados encontrados na curva de crescimento do *Clostridium sporogenes* estão representados na tabela 4.3. E os valores das médias de absorvância e do desvio padrão com relação ao tempo em horas estão representados na figura 4.5 e os valores relativos de UFC em relação ao tempo em horas estão representados na figura 4.6.

Tabela 4.3 Cinética de crescimento da bactéria anaeróbica *Clostridium sporogenes*.

Tempo (h)	Absorvância (660 nm)		UFC/ mL	
	Teste	Padrão	Teste	Padrão
0	0,08	0,09	$2,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
12	0,50	0,57	$3,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
24	0,54	0,60	710×10^6	640×10^6
36	0,52	0,53	460×10^6	420×10^6
48	0,49	0,47	44×10^6	69×10^6
60	0,41	0,36	20×10^6	39×10^6

Os valores representam a média de três experimentos independentes.

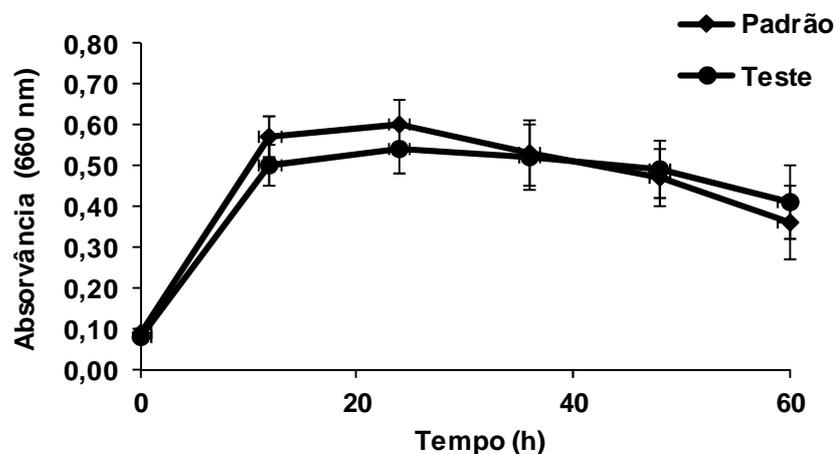


Figura 4.5 Cinética de crescimento, teste e padrão, do *Clostridium sporogenes* com monitoramento por absorvância em 660 nm com relação ao tempo em hora.

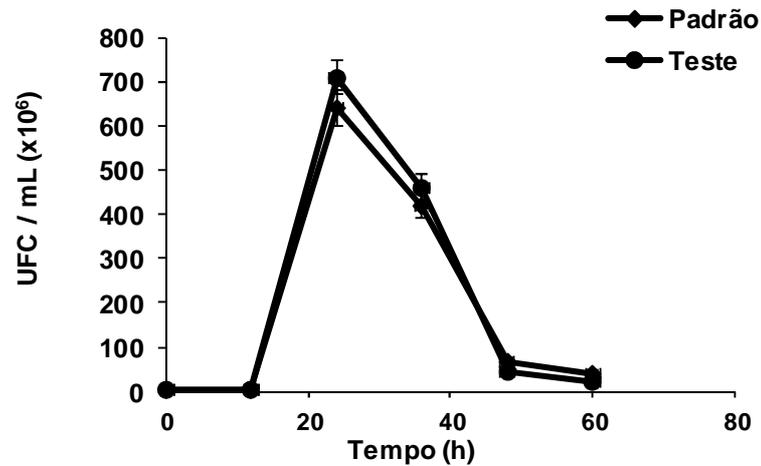


Figura 4.6 Cinética de crescimento, teste e padrão, do *Clostridium sporogenes* com monitoramento por UFC com relação ao tempo em hora.

Não houve correlação dos valores encontrados na leitura de absorvância e número de células viáveis desse microrganismo na fase lag da curva. Onde os valores de absorvância permaneceram inalterados enquanto que o número de células aumentou significativamente com o passar do tempo. Porém, a partir das 12 horas de cultivo, os valores de absorvância aumentaram acompanhando o aumento do número de células viáveis encontradas na suspensão. Havendo relação entre esses dois parâmetros nessa fase da curva do *Clostridium*, assim como na fase de declínio, onde os valores da absorvância diminuíram com a redução do número de células viáveis na medida com relação ao tempo.

4.4 Resultados dos microrganismos utilizados no desafio do isolador e suas quantificações

Os microrganismos eleitos para o estudo foram expostos ao gás de peróxido de hidrogênio, durante 10 minutos, em três concentrações diferentes em experimentos realizados com 12 repetições.

Tabela 4.4 Resultado da suspensão de *Candida albicans* após desafio no isolador.

Amostras	Absorvância	UFC/mL	Nº de células viáveis
Cultura não diluída	0,146	$4,2 \times 10^7$	Nenhuma
Diluída 1:2	0,081	$2,23 \times 10^7$	Nenhuma
Diluída 1:4	0,067	$1,6 \times 10^6$	Nenhuma

Média dos resultados obtidos em seis experimentos independentes realizados no isolador.

Tabela 4.5 Resultado da suspensão de *Micrococcus luteus* após desafio no isolador

Amostras	Absorvância	UFC/mL	Nº de células viáveis
Cultura não diluída	0,533	$1,9 \times 10^8$	Nenhuma
Diluída 1:2	0,474	$5,7 \times 10^7$	Nenhuma
Diluída 1:4	0,326	$2,2 \times 10^7$	Nenhuma

Média dos resultados obtidos em seis experimentos independentes realizados no isolador.

Tabela 4.6 Resultado da suspensão de *Clostridium sporogenes* após desafio no isolador.

Amostras	Absorvância	UFC/mL	Nº de células viáveis
Cultura não diluída	0,572	$2,6 \times 10^7$	Nenhuma
Diluída 1:2	0,367	$7,3 \times 10^6$	Nenhuma
Diluída 1:4	0,257	$6,7 \times 10^6$	Nenhuma

Média dos resultados obtidos em seis experimentos independentes realizados no isolador.

Os resultados dos desafios no isolador foram satisfatórios, indicando redução total da carga microbiana utilizada para teste.

4.5 Resultados do desafio no isolador

Foram realizados seis desafios do processo de descontaminação no isolador. Em cada desafio foram utilizadas três concentrações de *Candida albicans* três concentrações de *Micrococcus luteus* e três concentrações de *Clostridium sporogenes*, totalizando 108 amostras. Todas as amostras (conforme tabelas 4.4, 4.5 e 4.6) apresentaram no estudo ausência de células viáveis. Os resultados foram satisfatórios, indicando redução da biocarga pelo processo de descontaminação utilizando o biocida peróxido de hidrogênio.

Com relação aos esporos do *Clostridium sporogenes* não foi observada nenhuma manifestação de células viáveis após o desafio. Foram utilizados tubos com papéis de filtro estéreis, como controle negativo.

5 DISCUSSÃO

Com o advento do uso do isolador, em controle microbiológico para teste de esterilidade, a questão do resultado falso positivo relacionado às atividades de manipulação do operador, foi eliminada. Porém outro fator pode gerar esse tipo de resultado, a ineficiência no processo de descontaminação no isolador.

Neste estudo, procuramos avaliar o processo da biodescontaminação no módulo de trabalho, série 1993, do isolador La Calhène (França), utilizando como biocarga três microrganismos diferentes em carreadores de papéis de filtro, contaminados com três concentrações de células viáveis obtidas por curva de crescimento. A escolha do número de microrganismos utilizados no estudo ocorreu para que as análises dos resultados fossem mais consistentes, podendo no futuro abranger outros microrganismos para uma avaliação mais ampla do processo, como por exemplo: microrganismos fastidiosos de áreas limpas com resistência a biocidas (Braoudaki e Hilton, 2004).

Com a nova Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, a RDC 17 (2010), os critérios da verificação dos processos de limpeza, desinfecção e esterilização utilizados em laboratórios passaram a ser mais rígidos. A RDC 17 apresenta um capítulo destinado à tecnologia dos isoladores no âmbito da produção de produtos estéreis. Nosso estudo veio estabelecer a capacidade de descontaminação do gerador de vapor de peróxido de hidrogênio no sistema isolador, para alguns microrganismos que são manipulados em nosso laboratório, questão não relatada em literatura.

Verificamos em nossos experimentos, que o vapor de peróxido de hidrogênio é eficaz para esporos de *Clostridium sporogenes* em tempo de exposição de 10 minutos. Hall *et al* 2007, relatam que o vapor de peróxido de hidrogênio age rapidamente sobre esporos. O que também ocorre com os esporos de *Clostridium botulinum Beluga* quando inativados com vapor de peróxido de hidrogênio com tempo de exposição igual a 7 minutos (Johnston *et al* 2005). Porém o estudo requer

uma investigação mais detalhada devido a fatores como, temperatura de esporulação e meio de cultura capaz de influenciar na resistência dos mesmos.

A visualização dos esporos de *Clostridium sporogenes* foi obtida através de lâminas da suspensão bacteriana coradas pela metodologia de Gram com ótima visualização dos mesmos (Goulart *et al* 1999). Apesar de alguns autores indicarem corantes mais específicos (verde malaquita).

Neste estudo procuramos abordar a descontaminação do sistema isolador tendo como objetivo a comprovação de ação do agente biocida garantindo a validação do processo de descontaminação.

O resultado final do desafio da biodescontaminação executado pelo gerador de vapor de peróxido de hidrogênio (Clarus C), sobre o módulo de trabalho serie 1993, foi ausência total de células viáveis, utilizando tempo de 10 minutos na quarta fase do processo de descontaminação, conforme descrito em materiais e métodos. O que gerou confiabilidade no processo executado atualmente na seção de Esterilidade Processos e Insumos.

Foram realizados 108 avaliações de desempenho da tecnologia de descontaminação no isolador, com resultados satisfatórios para eliminação de biocargas utilizadas neste estudo.

Esses resultados são pertinentes ao sistema isolador que possui módulo de trabalho modelo 1993 e que utiliza como agente esterilizante o peróxido de hidrogênio. Podendo variar para outros isoladores com outras metodologias empregadas (Gouveia *et al* 2007).

Contudo a ação biocida do vapor de peróxido de hidrogênio foi comprovada na descontaminação de cabinas de segurança biológicas e salas de laboratório com manipulação do microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*. O gerador de vapor, Clarus R, com tempo de ação de 90 minutos, obteve resultados satisfatórios na inativação do microrganismo. Sendo esse processo de descontaminação sugerido como método alternativo para descontaminação de áreas de laboratório com manipulação de *Mycobacterium tuberculosis* (Hall *et al* 2007).

Sem dúvida nenhuma, o emprego de isolador na indústria farmacêutica veio contribuir de forma segura para qualidade do ar em processos assépticos, através da utilização de filtro HEPA dentro do sistema isolador, que retém partículas presentes na área de trabalho por troca contínua de ar, assim como, retenção de

partículas do ar liberado para exaustão, conferindo segurança ao meio ambiente (Tsukuda 2005).

Podemos através do estudo sugerir uma modificação no tempo gasto pelo processo de descontaminação no isolador, reduzindo o tempo da quarta fase do processo de descontaminação para 10 minutos, com base nos resultados alcançados. Sendo conveniente validar essa nova condição com outros microrganismos, principalmente utilizando o *Geobacillus stearothermophilus* (microrganismo padrão como bioindicador para processos a vapor). A biodescontaminação por vapor de peróxido de hidrogênio a baixa temperatura, como é utilizado no isolador de Bio-Manguinhos, é um método eficiente, podendo ser utilizado por período curto de tempo (Gouveia *et al* 2007) demonstrado por nossos resultados.

Os resultados obtidos nesse estudo favorecem a afirmação que o peróxido de hidrogênio possui ação eficaz. O vapor de peróxido de hidrogênio possui grande afinidade por materiais plásticos, o que torna a aeração dentro do equipamento longa. Atualmente são gastas 4 horas para que o processo reduza a concentração do vapor para 2 ppm (concentração estipulada pelo fabricante para utilização da área após descontaminação). Se o tempo de exposição ao vapor for reduzido, haverá uma maior redução no tempo de aeração, favorecendo um maior tempo de utilização do equipamento. Atualmente o isolador é descontaminado uma única vez ao dia, para um número aproximado de 20 amostras processadas. Com a redução do tempo gasto no ciclo de descontaminação o número de amostras testadas aumentaria atendendo a demanda de novos produtos.

O peróxido de hidrogênio consegue impregnar meios de cultura sólidos sem neutralizante, utilizados para monitoramento ambiental no isolador, sendo difícil sua remoção por aeração. Os microrganismos ficam inibidos com a presença do biocida peróxido de hidrogênio o que pode ocorrer falso controle ambiental (Horn *et al* 2002).

Foi essencial no nosso estudo conhecer a cinética de crescimento dos microrganismos para que pudéssemos através das informações obtidas ter o conhecimento do período em que os microrganismos se encontram na fase exponencial, e suas concentrações em absorvância onde é possível fazer uma correlação aproximada entre leitura de absorvância e número de células viáveis presentes nas suspensões.

O processo de descontaminação no isolador apresentou capacidade de eliminar dez milhões (10^7) de células viáveis de *Candida albicans* e *Clostridium sporogenes* e cem milhões (10^8) de células viáveis de *Micrococcus luteus*.

A bactéria *Micrococccus luteus* foi o microrganismo com maior velocidade de crescimento em comparação à levedura *Candida albicans*, com o mesmo tempo de cultivo.

O estudo de cinética de crescimento abordado neste trabalho serve de modelo para novas avaliações com outros microrganismos utilizados no teste de promoção de crescimento. Foi possível estabelecer um tempo menor do que dez minutos de descontaminação no isolador da La Calhène (França), utilizando o peróxido de hidrogênio a 30%, em substituição ao tempo de trinta minutos recomendado pelo fabricante. Apesar dos resultados satisfatórios, sugerimos que novos estudos sejam realizados utilizando diferentes biocargas, com bactérias com resistência a biocidas, em tempos reduzidos de biodescontaminação e concentração de peróxido de hidrogênio. O uso de suportes como plásticos, metal e vidro também deverão ser investigados.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Foram obtidas a cinética de crescimento dos microrganismos *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* e *Clostridium sporogenes* com monitoramento por parâmetros cinéticos de leitura de absorvância e contagem de número de células viáveis.
- ✓ As curvas de crescimento de *Candida albicans* e *Micrococcus luteus* apresentaram relação entre leitura de absorvância e número de células viáveis no período de cultivo de seis horas. Para a curva de crescimento do *Clostridium sporogenes* essa relação somente foi demonstrada partir do décimo segundo horário da curva, o que demonstra que este microrganismo possui uma velocidade de crescimento bastante diferente dos demais.
- ✓ O processo de descontaminação utilizado no sistema isolador La Calhène, módulo 1993 mostrou ser eficiente para os microrganismos: *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* e *Clostridium sporogenes* em três concentrações diferentes de biocargas.
- ✓ Foi possível constatar que o tempo gasto no ciclo de descontaminação no isolador La Calhène, módulo 1993, pode ser reduzido para dez minutos de duração na quarta fase do ciclo, devido os resultados obtidos nesse estudo demonstrando que o agente biocida é eficaz.
- ✓ No estudo também foi possível observar a ação do peróxido de hidrogênio com espectro de ação sobre: levedura, bactéria aeróbica e bactéria anaeróbica.
- ✓ Com os resultados demonstrados por eliminação das biocargas utilizadas no desafio do processo de descontaminação no isolador, desta forma conseguimos estabelecer os limites de ação do peróxido de hidrogênio no sistema.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Curso básico de controle de infecção hospitalar: Caderno C₁ Limpeza, Esterilização e Desinfecção de artigos e Anti-sepsia.** [on line] 2000 (capturado em 23/01/2010) Disponível em: www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/cihcaderno.pdf.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 17/2010 : Seção VII - Tecnologia de isoladores.**

ATCC. “**American type culture Colection**”). [on line] (capturado em 03 de março de 2011) Disponível em: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/Product/Details/tabid/452/Default.aspx>

Bio-Manguinhos. Programa **de monitoramento ambiental de Bio-Manguinhos.** Rio de Janeiro: Garantia da Qualidade de Biomanguinhos; 2011.

Bioquell. **Bioquell Pharma Clarus “C” routine maintenance manual STD 2000 – 007 (rev 8).** [manual de operação do gerador de gás de peróxido de hidrogênio] Inglaterra; 2000.

Bioquell. **Gerador de gás peróxido de hidrogênio.**[on line] 2010 (capturado em 15 de novembro 2010) disponível em: <http://www.bioquell.com/products/bioquell-clarus-c/>

Braoudaki M., Hilton AC. 2004. **Adaptive Resistance to Biocides in Salmonella entérica and Escherichia coli O157 and Cross-Resistance to Antomicrobial agents.** J. Clin. Microbiol 2004; 42(1):73-8.

Bustamante F. **Esterilização de Produtos para a Saúde.** Rev. SBCC 2005, 20: 40-1.

Cabrera, HR, Caballero GJ, Rojas DV. **Esterilización y desinfección.** Medicina Preventiva y Salud Pública 2001; 10.

Caçador MP. **Controle de biofilmes indesejáveis – utilização de biocidas em meios hospitalares.** Portugal; 2009 (dissertação) [Mestrado em Biotecnologia]- Universidade do Minho Escola de Engenharia.

Castellano, M. **Calidad total**. México: Editorial La Prensa Médica;1998.

Chapoux JJ, Falkow S, Neidhardt FC, Plorde JJ, Ray CG. **Medical Microbiology: na introduction to infectious diseases**. 3 ed.USA: Appleton & Lange Drew WL; 2010.

Colaço L. **isolador** [mensagem pessoal] Mensagem recebida por beatriz@bio.fiocruz.br em 21/08/2009.

Comissão Européia. **Manual de Boas práticas da Comissão Européia**. Bruxelas; 2003. Revisão do anexo 1.

Farmacopéia Brasileira. **Processo asséptico: Tecnologias alternativas para processo asséptico**. Brasília: ANVISA; 2010, 5 ed.

Fernandes AT.**Comparação da ação desinfetante em temperatura ambiente do peróxido de hidrogênio e do glutaraldeído**. [on line] 2000 (capturada em 27 janeiro 2010). Disponível em: <http://www.ccih.med.br/bibl-dez-2000-3.html>.

Goulart AE, Lopes AJ, Jansen JM, Paiva DD, Boia MN, Peralta JM. **Microsporidiose disseminada na Aids: relato de caso**. J.Penumol 1999; 25(1) 53-.6.

Gouveia VR, Pinheiro SMC, Graziano KU. **Métodos de esterilização por baixa-temperatura e novas tecnologias**. Rev. Latino-Am. Enfermagem 2007 maio-junho; 15 (3): 373-.6.

Hall L, Otter J.A, Chewins J, Wengenack N.L. **Use of Hydrogen Peroxide Vapor for Deactivation of Mycobacterium tuberculosis in a Biological Safety Cabinet and a Room**. J. Clin.Microbiol 2007; 45(3): 810-.15.

Higaskino CEK, Figel IC, Yamada MPA. **Controle de esterilização em produtos odonto-médicos hospitalares**. Sociedade Brasileira de Respostas Técnicas: [Dossiê técnico]. Instituto de Tecnologia do Paraná; 2007

Horn J, Backes M, Schepp EC, Wenz P. **Meio de cultura para monitoramento ambiental em isoladores com resíduo de peróxido de hidrogênio nas superfícies e no ar**. [on line] 2002 (capturado em 18 jan 2011).Disponível em www.sbcc.com.br/.../09ArtigoTecnico_MeioCulturaMonitoramento.pdf.

Johnston MD, Lawson S, Otter JA. **Evaluation of hydrogen vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with Clostridium botulinum spores**. J. Microbiol Methods 2005; 60: 403 - 11.

Krippner E. **Classificação de áreas limpas**. Rev. SBCC 2010; 44: 42-.5.

La Càlhene. **Two half –suit Workstation isolator serial 1993**. [Manual do módulo de trabalho do isolador La Calhène] França 2000.

Mattos IL, Shiraishi KA, Braz AD, Fernandes JR. **Peróxido de hidrogênio: importância e determinação.** Rev. Quím Nova 2003 maio- jun; 26 (3): 373-380.

Millipore. **Bomba de vácuo denominada de steritest.** [on line] 2010 (imagem capturada em 20 de agosto de 2010) Disponível em: <http://www.millipore.com.br>.

Moragas WM, Schneider MO. **Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil caminhos da geografia.** [on line] 2003 [capturado em 12 nov. 2010] Disponível em: www.ig.ufu.br/caminos-de-geografia.html.

Penna TCV, Machoshvili IA. **Esterilização térmica. Conceitos básicos da cinética de morte microbiana.** Rev. Farmácia Bioquímica 1997; (1): 1-5.

Pereira A. **Palestrante da Suíça visita a Funorte e fala sobre sistemas isoladores.** [on line] 2010 [capturado em 12 dez 2010] Disponível em: http://www.funorte.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=409%3A-palestrante-da-suica-visita-a-funorte-e-fala-sobre-sistemas-isoladores.

Pflug, IJ. **Microbiology and Engineering of Sterilization Process.** 10 ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

Pinto TJA. **Peróxido de hidrogênio como agente despirogenizante de componentes para produtos médico-hospitalares.** Rev. Saúde Pública 1995; 29(1): 75-9.

Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto AF. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos: Controle de produtos estéreis ênfase nos processos assépticos tecnologia de isoladores.** 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

Rosenberg, G.; Farias Filho JR, Quellos LG. **O processo de calibração de conformidades para a indústria farmacêutica.** Rev. Banas Qualidade 2000;94 : 90-6.

Rutala, WA – **APIC Guideline for selection and use of disinfectants.** Rev. Am. J. Infect. Control 1996; 24 (4): 313-342.

Santanna CCP. **Avaliação do monitoramento microbiológico ambiental das áreas limpas e dos laboratórios de febre amarela e liofilização na produção da vacina contra febre amarela.** Rio de Janeiro; 2007 (dissertação) [Pós graduação em biologia celular e molecular] – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos.

Santos GCM. **Redução da biocarga e garantia de esterilização em implantes mamários.** São Paulo; 2009 (dissertação) [Programa de pos graduação em fármaco e medicamentos área de produção e controle farmacêutico] - Universidade de São Paulo.

Serracarbassa PD, Dotto P. **Endoftalmite por *Candida albicans***. [on line] 2003 (capturado em 15 de julho de 2010) Disponível em: www.abonet.com.br/abo/665r/atc665_02.htm.

Shakeri SH, Kasra KR, Emtiazi G. ***Micrococcus luteus* is one of the bacteria that exists in water and industrial systems and shows high potential for biofilm formation**. Iran.J.Biol 2005; 18 (1): 5-14.

Souto C.R. **Medicamentos injetáveis: o ensaio de esterilidade na sua avaliação e outros aspectos considerados como medida de controle e respostas à Visa**. Rio de Janeiro; 2006 (monografia) [Curso de especialização em controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária] - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde /FIOCRUZ.

STEQ. **Isolador**. [on line] 2010 (capturado em 13 de agosto de 2010) Disponível em: www.steq.com.br

Tortora, GJ, Funke, BR, Case CL. **Introducción a la microbiología**.9 ed: Médica Panamericana; 2007.

Tsukuda S. **Isoladores alternativa para processos estéreis**. Rev. SBCC 2005; (18): 2-4.

Vsites.**Representação gráfica da curva de crescimento em sistema fechado**. [on line] 2010 (imagem capturada em 15 de maio de 2010) Disponível em: vsites.unb.br/16/col/.../crescimento/crescimento.html.