

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

**Avaliação da eficácia e aplicabilidade de processo de esterilização
por ozônio**

Túlia de Souza Botelho Almeida

Tese obtenção do título de Doutor

Orientadora:

Prof. Tit. Terezinha de J. Andreoli Pinto

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

**Avaliação da eficácia e aplicabilidade de processo de esterilização
por ozônio**

Túlia de Souza Botelho Almeida

Versão Original

Tese obtenção do título de Doutor

Orientadora:

Prof. Tit. Terezinha de J. Andreoli Pinto

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

B748a Botelho-Almeida, Túlia de Souza
Avaliação da eficácia e aplicabilidade de
processo de esterilização por ozônio / Túlia de Souza
Botelho-Almeida. - São Paulo, 2017.
99 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Esterilização. 2. Ozônio. 3. Biomateriais. I.
T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli,
orientador.

Túlia de Souza Botelho Almeida

**Avaliação da eficácia e aplicabilidade de processo de esterilização
por ozônio**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do título de Doutor

Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. Examinador

3º. examinador

4º. Examinador

São Paulo, _____ de 2017.

***“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram conquistadas
do que parecia impossível” (Charles Chaplin)***

DEDICATÓRIA

À Deus, meu Senhor, por tudo que tem feito na minha vida e pela constante presença, cuidado e amor.

Aos meus pais *Maurício* e *Luiza*, por acompanharem meus primeiros passos com paciência, por todo amor, carinho, fé e dedicação. Obrigada por acreditarem em mim, e nunca permitirem que eu mesma não acreditasse, por me apoiarem sempre e lutarem junto comigo na realização de mais esse sonho. Amo vocês!

Ao meu esposo e companheiro *Luiz Felipe Almeida* pela compreensão, carinho, apoio e estar sempre ao meu lado com paciência nos momentos de dificuldade. Amo-te!

As minhas irmãs *Isabela* e *Livia*, pela amizade, carinho, amor, compreensão e por tudo que somos juntas, uma base forte, consolidada no amor. Vocês e suas famílias são fundamentais na minha vida.

A querida Prof. Tit. *Terezinha de Jesus Andreoli Pinto*, pela oportunidade, orientação, confiança depositada, amizade, ensinamento e pela enorme contribuição em minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

A toda equipe da *BrasilOzônio e Ortosíntese* pela colaboração e apoio, em especial ao *Samy Menasce* e *Tais Cecchi* por estarem presentes em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Felipe Rebello Lourenço* pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A *Dr. Áurea Silveira Cruz*, do Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, pela disponibilidade e ajuda relacionada aos ensaios biológicos de citotoxicidade.

Ao colega do Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da USP *Adir José Moreira*, pela contribuição com o equipamento microscópio de varredura *SEM* e ajuda na análise dos dados.

A todos os colegas do Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo companheirismo durante esta caminhada.

A todos os colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as respectivas matérias-primas (CONFAR) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por toda colaboração na execução do presente trabalho, em especial a *Cleide* e *Diane* pela amizade e apoio.

Ao *Tiago Franco de Oliveira* pelas ilustrações do gráfico dos ciclos, do esquema da padronização dos microrganismos e dos dispositivos contendo tiras de papel.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho

RESUMO

RESUMO

Botelho-Almeida, T.S. **Avaliação da eficácia e aplicabilidade de processo de esterilização por ozônio**. 2017 99f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A busca contínua por tecnologias de esterilização a baixa temperatura deve-se à necessidade de adequação dos agentes esterilizantes às características físico-químicas dos produtos, à conveniência de maior rapidez no processamento, além dos apelos ambientais, em comparação, por exemplo, com o método de esterilização por óxido de etileno. Desta forma surgiu interesse pelo ozônio (O₃), o qual pode ser considerado o mais potente germicida natural que existe, sendo capaz de eliminar microrganismos (na forma vegetativa e esporulada) com alta eficiência e rapidez, graças a sua atividade altamente oxidante. O presente trabalho teve por objetivo proceder estudos para a determinação de parâmetros para o processo de esterilização empregando ozônio, além de avaliar a eficácia do agente esterilizante em questão. O processo de esterilização foi desafiado com esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 o qual se caracteriza frente as mesmas com elevada resistência. A eficácia esterilizante do ozônio foi avaliada através de carreadores inoculados com 10⁶ do esporo, introduzidos em seringas de 3 mL e tubos com diferentes comprimentos e diâmetros, simulando produtos médico hospitalares. Tais dispositivos foram submetidos a meio ciclo e ciclo completo do processo de esterilização por ozônio. A validação do processo foi comprovada através dos resultados satisfatórios para meio ciclo, obtidos com os testes efetuados. Desta forma, foi possível constatar a eficácia do processo de esterilização por ozônio. Adicionalmente, foram objeto de investigação materiais termossensíveis distintos obtidos de produtos médico-hospitalares, a fim de estudar a influência do ozônio sobre as características intrínsecas desses materiais. As amostras foram submetidas ao ciclo completo de esterilização e analisadas pelo teste de citotoxicidade *in vitro* e avaliação da superfície dos materiais por espectrofotometria com transformadas de *Fourier* com acessório de refletância atenuada (ATR-FTIR) para esclarecer eventuais efeitos do processo sobre a biocompatibilidade das mesmas. Embora os materiais estudados não demonstraram efeito citotóxico após serem submetidos à esterilização

por ozônio, a superfície do derivado de polietileno (PE) demonstrou uma banda de oxidação em consequência da ação do agente esterilizante.

Palavra-chave: Processo de esterilização, temperatura ambiente, Ozônio, biocompatibilidade.

ABSTRACT

ABSTRACT

Botelho-Almeida, T.S. **Evaluation of the effectiveness and applicability of the ozone sterilization process.** 2017 99f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Ozone (O₃) can be considered the most potent natural germicide against microorganisms (in vegetative and spore forms) with high efficiency and speed, because of its highly oxidizing activity. Despite this, there are a few studies describing the application of ozone as a sterilizing agent of medical devices. The aim of this paper was to describe the development and validation of a sterilization cycle applied to medical devices. The sterilization process was challenged with *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores, which have shown great resistance. The sterilizing effect of ozone was measured using carriers inoculated with 10⁶ spores, introduced into a 3 mL syringe and lumens of tubes of different sizes and diameters simulating hospital medical products, which have undergone a half-cycle or complete cycle. The validation process was confirmed by the satisfactory results for the half cycle, which indicate an appropriate sterility assurance level. Thus, one can consider the ozone sterilization process effective for medical devices. On the other hand, there was a need to evaluate the safety of ozone sterilization in terms of medical device materials in order to clarify the influence of ozone on the intrinsic characteristics of these materials. The samples were submitted to the complete cycle of sterilization and analysis by the “in vitro” cytotoxicity test and evaluation of the surface of the materials using ATR-FTIR spectrometry to clarify eventual of the process on a biocompatibility. Although the materials studied did not demonstrate a cytotoxic effect after being subjected to ozone sterilization, the surface of the polyethylene (PE) derivative demonstrated an oxidation band as a consequence of the action of the sterilizing agent.

Keywords: Sterilization, low-temperature, ozone, biocompatibility

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estrutura molecular do ozônio devido à ressonância magnética	28
Figura 2	Diagrama mostrando os principais componentes de um espectrômetro FTIR	36
Figura 3	Possível esquema de reação do ozônio com produtos à base de polietileno	39
Figura 4	Vista frontal da Autoclave Ozônio – porta fechada	44
Figura 5	Vista interna da Câmara de Esterilização Autoclave Ozônio com testes acomodados nas prateleiras.	45
Figura 6	Fluxograma Esquemático do Sistema de Esterilização a Base de Ozônio	46
Figura 7	Esquema representando um pulso com vácuo, preenchimento da câmara com ozônio, patamar (exposição do gás) e vácuo.	47
Figura 8	Esquema de preparo e padronização dos microrganismos na forma vegetativa.	48
Figura 9	Esquema de distribuição dos Indicadores Biológicos (<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953) em 10 diferentes pontos (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10), no interior da câmara do esterilizador a ozônio.	51
Figura 10	Distribuição na câmara do Esterilizador por Ozônio dos desafios com seringas de polipropileno de 3 mL.	54
Figura 11	Estruturas de canulados composto por aço inoxidável e silicone que variam entre 45 e 70 cm de comprimento, de	55

acordo com o diâmetro (0,5 mm x 45 cm; 1 mm x 50 cm; 2 mm x 57,5 cm; 3 mm x 65 cm e 4 mm x 70 cm).

Figura 12	IB aberto nas extremidades.	56
Figura 13	Adição de Dispositivo contendo tiras impregnadas com carga de 10^6 de esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 nos desafios canulados.	56
Figura 14	IB introduzido no interior do canulado de silicone, representando o monitor biológico	57
Figura 15	Canulado de aço inoxidável, utilizado como monitor biológico, embalado juntamente com o IB.	57
Figura 16	Canulado de silicone, utilizado como monitor biológico, embalado juntamente com o IB.	57
Figura 17	Distribuição, intercaladamente, de um mesmo comprimento e diâmetro dos monitores biológicos de canulados de aço inoxidável e silicone, dentro da câmara do esterilizador a base de ozônio.	58
Figura 18	Análise qualitativa dos monitores biológicos em caldo TSB	59
Figura 19	Amostras de materiais médico-hospitalares: 1 – máscara infantil (silicone); 2 – conector (silicone); 3 – balão reservatório; 4 – máscara recém nato (silicone); 5 – umidificador (polietileno); 6 – traqueia (silicone) e 7 – máscara para macronebulização (policloreto de vinila)	61
Figura 20	Distribuição na câmara do Esterilizador por Ozônio dos frascos contendo endotoxina bacteriana para teste de pirogênio	63
Figura 21	Esquema de distribuição das soluções padrões de endotoxina, nas concentrações de 0,005 EU/mL (P1), 0,050 EU/mL (P2), 0,500 EU/mL (P3), 5,000 EU/mL (P4) e 50,000	64

EU/mL (P5); das soluções das amostras dos frascos reconstituídos de endotoxina esterilizados (A, B, C, D), assim como das suas diluições (A10⁻¹, A10⁻², B10⁻¹, B10⁻², C10⁻¹, C10⁻², D10⁻¹, D10⁻²) com controle negativo como o branco (BC) e controle positivo (CP).

Figura 22	Equipamento de deposição de ouro marca Edwards, modelo “ <i>sputter coater 5150B</i> ”.	65
Figura 23	Esquema representando o meio ciclo e ciclo completo de esterilização por ozônio.	73
Figura 24	Eletromicrografia de esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 feita por Microscopia Eletrônica de Varredura, antes (a) e depois (b) de passarem pelo processo de esterilização por ozônio	75
Figura 25	Espectros de ATR-FTIR de polietileno (PE) antes e depois da ação do ozônio como agente esterilizante.	81
Figura 26	Espectros de ATR-FTIR de policloreto de vinila (PVC) antes e depois da ação do ozônio como agente esterilizante	82
Figura 27	Espectros de ATR-FTIR de materiais médico-hospitalares de Silicone (Si) antes e depois da ação do ozônio como agente esterilizante	83

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Tempo de exposição em condições físicas constantes de esterilização por ozônio em minutos (min) representado por pulsos.	47
Tabela 2	Materiais médico-hospitalares e seus respectivos componentes analisados quanto a citotoxicidade após submetidos ao processo completo de esterilização por ozônio, em triplicata, totalizando 21 amostras.	62
Tabela 3	Resultado do valor D das tiras impregnadas com diferentes microrganismos na forma vegetativa, em relação ao tempo necessário para redução logarítmica (Valor Final) da carga microbiana inicial (Valor Inicial), submetidas ao processo de esterilização por ozônio	69
Tabela 4	Resultados em triplicata dos testes com 5 indicadores biológicos de esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> em cada uma das 10 posições distintas dentro da câmara preenchida com material médico hospitalar para os diferentes tempos de exposição ao ozônio.	71
Tabela 5	Resultado do Valor D em minutos (min) para esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> calculado para cada uma das posições dos IB distribuídos no interior da câmara e a média destes valores.	74
Tabela 6	Resultados das três réplicas dos testes qualitativos dos canulados de silicone e aço inoxidável (Inox), submetidos ao meio ciclo do processo de esterilização por ozônio.	78
Tabela 7	Resultados das três réplicas dos testes quantitativos, plaqueados em duplicata, dos canulados de silicone e aço inoxidável (Inox), submetidos ao meio ciclo do processo de esterilização por ozônio.	79
Tabela 8	Resultados do teste de endotoxina bacteriana, em triplicata, submetidos ao ciclo completo do esterilizador por ozônio	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	Reflexão total atenuada
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> com acessório de reflectância total atenuada
ATV	Associação de tripsina 0,20 % e versene 0,02 %
DPR	Desvio padrão relativo
ECV	<i>Endotoxin Challeng Vials</i>
ETD	Everhardt-thornley detector
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
IB	Indicador biológico
IC	Intervalo de confiança
IR	Infravermelho
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LAL	Lisado de Amebócitos de Limulus
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meio mínimo de Eagle
NCTC	<i>National Collection of Tissue Cultures</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PE	Polietileno
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PP	Polipropileno
PVC	Poli (cloreto de vinila)
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SFB	Soro fetal bovino
Si	Silicone
TSA	Ágar triptona soja
TSB	Caldo triptona soja
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

UV	Ultravioleta
UVO	Ultravioleta com ozônio
Valor D	Parâmetro de resistência do microrganismo sensor do processo esterilizante

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
μm	Micrometro
cm	Centímetro
Cm⁻¹	Unidade por centímetro (unidade/cm)
Cm²	Centímetro quadrado
g/ N.m³	Gramas por metro cúbico
KBr	Brometo de potássio
Kv	Kilovolt
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
O₂	Oxigênio
O₃	Ozônio
ppm	Partes por milhão
UE	Unidade de endotoxina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Aspectos gerais dos processos de esterilização	25
2.2 Gás ozônio	27
2.2.1 Aplicação do ozônio como agente esterilizante: método e equipamento	30
2.3 Mecanismo de inativação do gás ozônio	31
2.3.1 Bactérias vegetativas	32
2.3.2 Esporos bacterianos	32
2.4 Métodos de avaliação da biocompatibilidade de materiais termossensíveis com o processo de esterilização por ozônio	33
2.4.1 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	33
2.4.2 Processo de despirogenização (endotoxina)	34
2.4.3 Estudo por espectroscopia no infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	35
3 OBJETIVOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Material	44
4.1.1 Equipamento, sistema e processo de esterilização por ozônio	44
4.2 Métodos	48
4.2.1 Estudo com microrganismos na forma vegetativa	48
4.2.2 Estudo com microrganismo na forma esporulada	49
4.3 Desenvolvimento do processo de esterilização	50
4.3.1 Estudo de detecção de letalidade microbiana	51
4.3.1.1 Método qualitativo (fração negativa)	51
4.3.1.2 Método quantitativo (enumeração direta)	52
4.4 Cálculo do valor D	52
4.5 Desafio com produtos simulados (monitores)	53
4.5.1 Seringas de polipropileno de 3 mL	53
4.5.2 Desafio com estruturas canuladas (monitores com formas tubulares)	55
4.6 Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método biológico de difusão em ágar	60

4.7 Estudo por espectroscopia no infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	62
4.8 Estudo da eficácia do processo de despirogenização (endotoxina)	62
4.9 Microscopia Eletônica de Varredura (SEM).....	64
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	68
5.1 Desenvolvimento do processo de esterilização.....	68
5.1.1 Estudo com microrganismos na forma vegetativa	68
5.1.2 Estudo com microrganismo na forma esporulada	70
5.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	75
5.3 Desafio com produtos simulados	76
5.3.1 Seringas de polipropileno de 3 mL	76
5.3.2 Estruturas canuladas de aço inoxidável e de silicone	77
5.4 Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método biológico de difusão em ágar	80
5.5 Estudo por espectroscopia no infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	81
5.6 Estudo da eficácia do processo de depirogenização (endotoxina).....	84
6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	88

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O processo de esterilização tem a finalidade de remover ou destruir todas as formas de vida microbiana. Deve conduzir o produto submetido ao processo a um nível de esterilidade segura, ou seja, permitir ao mesmo total ausência de formas viáveis capazes de reprodução (PINTO et al, 2015).

As várias limitações dos métodos de esterilização, principalmente para materiais sensíveis a altas temperaturas, tem estimulado o desenvolvimento de técnicas alternativas (MIOSAN et al., 2001). Entretanto, atualmente, não existe um método de esterilização, em desenvolvimento ou já aprovado para materiais sensíveis a calor, que atenda todas as características ideais, tais como ampla eficácia, curto tempo de esterilização, aplicabilidade em materiais e objetos variados, alta penetrabilidade, atóxicidade, resistência a matéria orgânica e com custo acessível para instalação e operação (MIOSAN et al., 2001; RUTALA; WEBER et al., 2008).

O tipo do material, e particularmente a sua termorresistência, é um dos fatores determinantes para selecionar o melhor processo de esterilização do mesmo. Os métodos descritos nas farmacopéias podem ser físicos e químicos. Dentre os físicos, o calor é o mais comumente utilizado por ser simples, econômico e seguro, podendo ser sob a forma úmida e seca. Há também, no método físico, a radiação ionizante e não ionizante, e a filtração. Os métodos químicos, indicados para materiais e produtos termossensíveis, podem ser aplicados com o agente esterilizante sob a forma líquida, gasosa (óxido de etileno, dióxido de cloro, ozônio) e vapor (peróxido de hidrogênio, ácido peracético, ou formaldeído) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et al. 2015; USP, 2016).

O crescente desenvolvimento de materiais termossensíveis, destinados à saúde, tem exigido aprimoramento dos métodos de esterilização à baixa temperatura. Para este tipo de material, o gás óxido de etileno é o mais comumente utilizado, sendo seguido pelo plasma de peróxido de hidrogênio e pelo vapor a baixa temperatura e formaldeído (GRAZIANO, 2003; PINTO et. al. 2015), e mais recentemente, vislumbra-se o emprego do equipamento a base de ozônio.

A tecnologia empregando ozônio surge como opção interessante na busca contínua por tecnologias de esterilização a baixa temperatura, tendo em vista a necessidade de adequação dos agentes esterilizantes às características físico-

químicas dos produtos, a conveniência de maior rapidez no processamento, além dos apelos ambientais, em comparação com os métodos normalmente utilizados. Adicionalmente, o esterilizador a ozônio torna-se um processo interessante por utilizar matéria-prima natural (oxigênio, O_2), ocorre à baixa temperatura, com baixo custo, e, apesar de tóxico, rapidamente se dissocia em oxigênio, favorecendo ao meio ambiente (MOAT et al., 2009).

O ozônio (O_3) é produzido naturalmente na atmosfera pela ação fotoquímica dos raios ultravioleta sobre as moléculas de oxigênio. É constituído por três átomos de oxigênio e possui meia vida de aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente (MOAT et al., 2009), é facilmente solúvel em água e altamente oxidativo. Esta última característica, combinada com a sua solubilidade, é que o torna um excelente candidato para uso como esterilizante (SOUSA et al., 2010).

A já enfatizada necessidade de novas técnicas e metodologias com o intuito de esterilizar materiais sensíveis à alta temperatura, faz-se presente devido à elevada demanda de produtos farmacêuticos parenterais, e dispositivos médico-hospitalares empregados na sua administração ou implantáveis. Para a utilização apropriada nestes grupos de produtos, é requerida a validação do processo. Deve-se demonstrar a segurança na sua aplicação quanto a letalidade microbiana, a aplicabilidade em materiais e a inocuidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2016).

Sendo assim, considerando-se suas características anteriormente apontadas e a difusibilidade do agente permitindo o alcance desejado, o esterilizador a ozônio torna-se um processo promissor, para materiais termossensíveis, tendo em vista que a incessante inovação tecnológica se traduz na incorporação de novos produtos, com ampla diversidade de conformações e matéria-prima. Também, a crescente tendência na adoção da responsabilidade e sustentabilidade ambiental o privilegiam, por utilizar matéria-prima natural (O_2), favorecendo ao meio ambiente.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais dos processos de esterilização

A esterilização de instrumentos e artigos médico-hospitalares gera preocupação para autoridades públicas e órgãos fiscalizadores quanto à garantia da qualidade do processo de esterilização desses produtos e, conseqüentemente, a segurança do paciente (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; GONÇALVES, 2013).

Considerando os métodos descritos nas farmacopéias (físicos e químicos), dentre os físicos há o calor sob a forma úmida e seca, a radiação ionizante e não ionizante e a filtração. Os métodos químicos, indicados para materiais e produtos termossensíveis, podem ser sob a forma líquida, gasosa (óxido de etileno, dióxido de cloro, ozônio) e vapor (peróxido de hidrogênio, ácido paracético, ou formaldeído) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et. al. 2015; USP, 2016).

O método de esterilização mais amplamente utilizado é o calor. Entretanto os dispositivos médico-hospitalares, em sua maioria, são fabricados com material termossensível, podendo ser degradado a elevadas temperaturas. A preocupação com aspectos físico-químicos, biocompatibilidade e estabilidade permitirão ciclos de vida mais longos ao produto, com otimização na segurança ao paciente (ROGERS, 2005).

O crescente desenvolvimento de materiais termossensíveis, destinados à saúde, tem exigido aprimoramento dos métodos de esterilização a baixa temperatura. Para este tipo de material, o gás óxido de etileno é o mais comumente utilizado, sendo seguido pelo plasma de peróxido de hidrogênio e pelo vapor a baixa temperatura e formaldeído (GRAZIANO, 2003; PINTO et al. 2015).

O óxido de etileno é um gás inflamável, explosivo e carcinogênico que, quando misturado sob determinadas proporções com gases inertes, torna-se não inflamável ou explosivo (NOGAROTO; PENHA, 2006). Entretanto possui desvantagens envolvendo aspectos de toxicidade ocupacional, ambiental e ao paciente (OLIVEIRA, 2007), além de interações intrínsecas aos mesmos (SHINTANI, 1995).

A busca contínua por tecnologias de esterilização a baixa temperatura deve-se à necessidade de adequação dos agentes esterilizantes às características físico-químicas dos produtos, à conveniência de maior rapidez no processamento, além dos

apelos ambientais, em comparação com os métodos normalmente utilizados. Com isso, a possibilidade do emprego de esterilizador a ozônio torna-se um processo interessante por utilizar matéria-prima natural (O₂), operar sob baixa temperatura, apresentar baixo custo, e, apesar da toxicidade do ozônio, este rapidamente se dissocia em oxigênio, condição favorável ao meio ambiente (MOAT et al., 2009).

Os métodos de esterilização devem permitir que se assegure níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas em produtos farmacêuticos, médico-hospitalares e alimentícios (NOGAROTO; PENNA, 2006). O nível de garantia de esterilidade, ou *Sterility Assurance Level* (SAL), de um processo para um determinado produto é estabelecido por meio de estudos de validação apropriados e geralmente é aceito que produtos injetáveis ou dispositivos críticos estéreis submetidos à esterilização terminal devem alcançar uma probabilidade de sobrevivência igual ou inferior a 10^{-6} (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et al. 2015).

A inclinação da curva de morte microbiana é uma propriedade inerente do microrganismo sujeito à esterilização e às condições do próprio processo aplicado. A inclinação desta curva conduz ao tempo necessário, em minutos, para que a população microbiana seja reduzida em 90% (ou um ciclo logarítmico), a uma condição específica, isso é, ao tempo para uma fração sobrevivente de 1/10, comumente denominado valor D (tempo de redução decimal) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et al., 2015).

Há dois métodos frequentemente empregados para determinar o valor D (PINTO et al., 2015). O método de enumeração direta ou curva de sobreviventes, onde uma população conhecida de microrganismos é exposta ao agente letal em questão, sendo as amostras retiradas após diferentes tempos de exposição ao processo e analisadas por método de contagem ou enumeração, previamente validado (plaqueamento); e o da fração negativa ou método quantal, em que réplicas contendo população conhecida de microrganismos são expostas a diferentes níveis de inativação. Neste método, após procedimentos adequados, o conjunto de unidades é qualitativamente avaliada quanto ao crescimento, ou não (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2016).

Um recurso amplamente empregado para avaliar ou estimar o efeito do processo esterilizante consiste na adoção de monitores ou indicadores biológicos (IB) contendo esporos de microrganismos altamente resistentes ao processo, empregados

para sua validação e durante sua avaliação rotineira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O indicador biológico é um dispositivo constituído de um suporte onde são inoculados os esporos (forma de resistência) microbianos de uma cepa de elevada resistência ao processo. Este suporte pode ser constituído de diferentes materiais sendo mais comumente utilizados tiras celulósicas. Tais tiras inoculadas são acondicionadas em uma embalagem protetora simples, ou fazem parte de um sistema mais complexo, que agrega uma ampola de meio de cultura contendo indicador de pH, constituindo, neste caso, o indicador autocontido (PINTO, 1991; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2016).

A ISO 14937 exemplifica alguns potenciais microrganismos para ensaio na forma de esporos bacterianos, bactéria vegetativa, fungos, micobactérias, vírus e parasitas. Estudos de validação, encontrados na literatura, de processos de esterilização por ozônio utilizam o *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, usualmente conhecido como *Bacillus stearothermophilus*, com a carga de 10^6 , como indicador biológico (SHINTANI et al., 2003; SAKURAI et al., 2003; DUFRESNE et al., 2008).

Esta estratégia é semelhante àquela adotada para processos de esterilização por vapor, o qual utiliza esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 como indicador biológico. Há também, o processo por calor seco, cuja distribuição no equipamento deve ser a mais uniforme possível e utiliza como indicador biológico esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9732. Assim como para o processo de esterilização pelo gás óxido de etileno, utiliza o mesmo indicador biológico do calor seco para avaliar a eficácia do seu processo.

2.2. Gás ozônio

O gás ozônio começou a ser conhecido em 1781, quando pela primeira vez seu odor característico foi detectado, e somente em 1837 o ozônio foi reconhecido como uma substância química. Mesmo assim, trinta anos se passaram para que em 1867, a fórmula triatômica do ozônio fosse descrita e aceita (BOCCI, 2005).

O composto ozônio é uma forma alotrópica do elemento oxigênio, formado por 3 átomos de oxigênio ligados covalentemente (Figura 1), com um ângulo de 127° entre

eles. Por ser um composto muito instável, possui meia vida de aproximadamente 20 minutos, e se desintegra facilmente em oxigênio, voltando à sua conformação original, o que o diferencia proporcionando condição favorável ao meio ambiente (BOCCI, 2005; MOAT et al., 2009). Em seu estado gasoso, é facilmente solúvel em água, além de ser altamente oxidante. Estas características, combinadas com a sua solubilidade, fazem do ozônio um excelente candidato para uso como esterilizante (SOUSA et al., 2011).

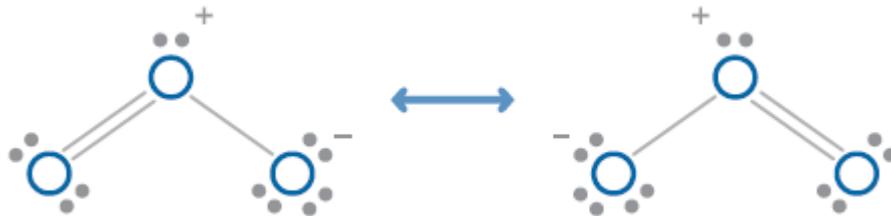


Figura 1: Estrutura molecular do ozônio devido à ressonância magnética (SILVA et al., 2011)

O ozônio pode ser considerado o mais potente dentre os germicidas naturais existentes, sendo capaz de eliminar vírus, bactérias, protozoários e fungos com alta eficiência e rapidez (RICKLOFF, 1987; BOCCI, 1993). A sua capacidade oxidativa é maior que a do peróxido de hidrogênio e do ácido peracético, o que o torna mais efetivo e eficaz como agente esterilizante (MURPHY, 2006).

A propriedade do ozônio na desinfecção de água foi descoberta em 1886 e em 1891 testes pilotos de seu emprego em sistemas de abastecimento aquífero eram realizados em Martinkelfelde, na Alemanha. No entanto, a primeira instalação de ozônio em escala industrial ocorreu em 1893, em Oudshoorn, na Holanda, objetivando a desinfecção de água na estação de tratamento de água potável desta cidade (BOCCI, 2005). A finalidade do tratamento com ozônio difere nos usos para desinfecção de água e para desinfecção de esgoto. No primeiro caso, a inativação dos organismos patogênicos é obrigatoriamente total, enquanto que no segundo caso, é permitida a inativação parcial dos patogênicos, com concentração residual de microrganismos variando de acordo com o uso pretendido para esgoto tratado (CHERNICHARO et al,1999).

O ozônio tem sido objeto de diversos estudos devido a suas propriedades químicas ímpares, que lhe dão a possibilidade de ser utilizado em diversas

especialidades médicas, devido ao seu grande potencial bacteriológico e imunostimulante (BOCCI, 1993)

Os primeiros relatos do uso clínico do ozônio datam da I Guerra Mundial (BOCCI, 2005; JORGE et al., 2006), onde úlceras gangrenosas foram tratadas através da insuflagem direta do gás sobre os tecidos (SUNNEN, 1988; JORGE et al., 2006).

O uso indiscriminado do ozônio seja pela infusão venosa em altas doses, ou mesmo através da utilização por práticos, fez com que houvesse grande número de pessoas mortas por embolia, resultando na proibição pelo *Food Drug Administration* em diversos estados americanos. É importante ressaltar que, devido à inexistência na época de materiais adequados para a aplicação do gás, aliada à descoberta e difusão de antibióticos, o ozônio caiu em desuso, assim permanecendo durante muito tempo (SUNNEN, 1988; BOCCI, 2005).

Apesar da grande importância desempenhada pela camada de ozônio, a presença do gás na superfície terrestre é nociva à saúde humana, já que misturas gasosas contendo ozônio e outros compostos, são altamente tóxicas para os pulmões (BOCCI, 2005), trato nasorrespiratório (SALMON et al., 1998; BELL et al., 2004) e olhos (SUNNEN, 1988), sistemas que não possuem mecanismos eficientes para modular a ação oxidante destas misturas (BOCCI, 2005).

Embora o ozônio apresente características altamente tóxicas, por ele ser formado a partir de oxigênio puro através de um processo endotérmico permitido por gradientes em alta tensão entre os eletrodos do equipamento, sua reação é reversível. Ou seja, o ozônio se decompõe espontaneamente voltando à sua forma original (oxigênio), de modo que sob a temperatura de 20 °C, a concentração de ozônio é reduzida em cerca de 50 %, em 40 minutos, e sob a temperatura de 30 °C este tempo decai para 25 minutos. Tal característica diminui o risco ocupacional ao se trabalhar com o gás ozônio, o qual adicionalmente não emite resíduos tóxicos ao meio ambiente (BOCCI, 2005).

No início da utilização de ozônio como um biocida gasoso no ar ambiente, adotaram-se níveis máximos de concentração de cerca de 1 ppm. Em estudo realizado empregando suspensões bacterianas em aerossol, em uma sala a temperatura e umidade relativa conhecidas, Elford e Van de Eude (1942) determinaram que concentrações de ozônio acima de 1 ppm associadas a 60-80% de umidade relativa apresentaram melhor atividade microbicida relativamente a uma atmosfera seca. Kowalski et al. (1998) estudaram a influência de concentrações mais

elevadas de ozônio no ar, sobre bactérias *E. coli* e *S. aureus* na forma vegetativas. Os microrganismos foram expostos ao ozônio presente no ar ambiente, sob concentrações na faixa de 300 a 1500 ppm por 10 a 480 segundos com 18-20 % de umidade relativa: taxas de mortalidade superiores a 99,99 % (> 4 log) foram alcançados para ambas as espécies, a 1500 ppm, no período de 8 minutos.

Há anos diferentes países utilizam o ozônio em diversos processos industriais, redes de tratamento de água e condicionamento de alimentos (CHO et al., 2003; JORGE et al., 2006). Apesar de estar sendo utilizado na desinfecção de água por longo período de tempo e em desinfecção de ambientes, apenas recentemente é que a tecnologia de ozônio gasoso umidificado foi autorizado para fins de esterilização (DUFRESNE et al., 2008).

2.2.1. Aplicação do ozônio como agente esterilizante: método e equipamento

Diferentes estudos demonstram a eficácia de esterilização por ozônio para produtos odontológicos (MASSUDA et al., 1990), polímeros (SHINTANI, 2003), aço inoxidável (SAKURAI, 2003), inclusive em lumens de diferentes tamanhos e diâmetros (DUFRESNE, 2008), nanofibras de Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, (REDIGUIERI et al., 2016), assim como seu potencial de letalidade sobre *Bacillus anthrax* (BURANOV, 2005).

Utilizando-se ozônio gasoso seco em concentrações elevadas, foram realizados estudos quanto à descontaminação de resíduos hospitalares contaminados por bactérias Gram (+) e Gram (-) vegetativas, fungos, micobactérias e bactérias esporuladas tais como *Bacillus atropheus*, *Geobacillus stearothermophilus* e *Clostridium perfringens*. Foram empregadas nos testes concentrações de ozônio de 10.000 a 12.000 ppm, obtidas a partir de descargas de ar seco por sistema do tipo *corona*. Este sistema permitiu a inativação de níveis acima de 10^7 UFC / mL de bactérias na forma vegetativa: (*S. aureus*, *E. coli*) em período de tempo de exposição de uma hora, e de níveis acima de 10^7 UFC / mL, quando na forma esporulada, em duas horas de tratamento (CORONEL et al, 2002).

Estudo desenvolvido quanto a atividade esporicida do ozônio (concentrações de 250 a 1500 ppm) sobre diferentes cepas de *Bacillus* na forma esporulada, permitiu

avaliar a influência do nível de umidade relativa no processo. Níveis de 50 % ou inferiores, ocasionaram redução sensível quanto ao número de sobreviventes, após 6 horas de exposição (ISHIZAKI et al., 1986). No entanto, em um outro estudo realizado com valores superiores de umidade relativa, foi obtida uma redução de cinco log em menos de duas horas de exposição ao ozônio (CURRIER et al., 2001).

Estes estudos demonstram que além da importância da maior concentração de ozônio, quanto mais alto o nível de umidade relativa (acima de 50 %), mais eficiente é o processo de inativação. Desta forma, caracteriza-se a umidade como absolutamente necessária para atingir o atributo esterilidade.

No ano de 2003, foi desenvolvido por uma empresa canadense (TSO3. Inc®) um processo utilizando o ozônio como único agente esterilizante (MURPHY, 2006), tendo sido aprovado pela *Health Canada* e *Food Drug Administration* (FDA). Esta tecnologia foi considerada segura e rápida, constituindo uma alternativa econômica de esterilização a baixa temperatura (MURPHY, 2006; DUFRESNE, 2008; MAHFOUDH et al., 2010). A eficácia deste processo foi estabelecida ao se atingir um Nível de Garantia de Esterilidade de 10^{-6} (*Sterility Assurance Level - SAL*) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et al., 2015; USP, 2016).

O equipamento proposto, objetivo do presente estudo e operando sob condições físicas semelhantes às acima descritas, consiste no esterilizador por ozônio fabricado pela empresa Ortosíntese Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil). Neste equipamento, são preconizados como parâmetros de trabalho concentração elevada do gás ozônio (acima de 7 g/ N.m³, ou seja, aproximadamente 35.000 ppm), umidade relativa entre 80 e 95 % e temperatura ambiente (30 - 35 °C). Conforme mencionado anteriormente, a alta concentração de ozônio associada à umidade elevada deve caracterizar o processo de esterilização como eficaz.

2.3. Mecanismo de inativação do gás ozônio

Substâncias fortemente oxidantes são geralmente capazes de agir sobre a constituintes químicos de microrganismos, ou seja, proteínas, lipídeos insaturados, lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas, enzimas intracelulares (por exemplo, enzimas respiratórias) e ácidos nucleicos (material genético), bem como

proteínas e peptidoglicanos presentes em paredes de esporos e cápsulas de vírus (TSENG; LI, 2008).

2.3.1. Bactérias vegetativas

A inativação de bactérias vegetativas por ozônio envolve um processo complexo, pois entidades químicas presentes no gás proporcionam ataques a um grande número e diversidade de componentes. No entanto, acredita-se que as principais reações consistam em oxidação de lipídios e proteínas presentes na parede da célula bacteriana, assim como na membrana citoplasmática. A degradação progressiva dessas estruturas promove alterações na permeabilidade e, conseqüentemente, na integridade das células, sendo frequentemente seguida por lise celular (BROADWATER et al, 1973; KIM; YOUSEF, 2000; KHADRE; YOUSEF 2001; THANOMSUB et al, 2002).

Nessa linha, Kim e Yousef (2000) observaram que o dano foi mais pronunciado para as bactérias Gram-negativas (por exemplo *E. coli*), provavelmente devido à camada de lipopolissacarídeos presente nas mesmas, comparativamente às Gram-positivas (por exemplo *S. aureus*) (KOMANAPALI; LAU, 1998; KOMANAPALI; LAU, 1996). Hunt e Marinas (1999) propuseram uma explicação diferente para a inativação de bactérias. Registros apresentados pelos autores, obtidos por microscopia eletrônica de transmissão, permitem observar contração do núcleo de *E.coli* após tratamento com ozônio. Os autores concluíram ser o ozônio capaz de penetrar nas células e reagir com as proteínas ou enzimas envolvidas na replicação da fita de DNA desta bactéria.

2.3.2. Esporos bacterianos

O interesse principal em trabalhar com esporos bacterianos decorre de sua maior resistência, o que os torna opções de escolha, inclusive em normas, recomendações e exigências indispensáveis para validar os processos de esterilização (ISO, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et al., 2015; USP, 2016). Esporos bacterianos podem suportar tratamentos agressivos, incluindo

aqueles de natureza térmica, radiação, produtos químicos e dessecação. Os esporos de bactérias de espécies de *Bacillus* têm se mostrado particularmente resistentes ao ozônio (KOWALSKI et al., 1998, PINTO et al., 2015). Tal constatação é coerente, mediante o fato de que esporos de bactérias, em virtude de sua proteção multicamada e resistência ao estresse, são menos afetados pelos diferentes agentes e inclusive pelo ozônio em comparação às bactérias em sua forma vegetativa.

2.4. Métodos de avaliação da biocompatibilidade de materiais termossensíveis com o processo de esterilização por ozônio.

Devido ao processo de esterilização por ozônio ser altamente oxidativo, faz-se importante assegurar a biocompatibilidade do material submetido ao mesmo.

Dentre as técnicas adequadas para proporcionar estudos abrangentes, citam-se métodos espectroscópicos, microscópicos, termodinâmicos, e outros complementares, como métodos biológicos (MERRET et al., 2002; USP, 2016).

2.4.1. Citotoxicidade *in vitro*

O teste de citotoxicidade *in vitro* tem por objetivo avaliar a biocompatibilidade de um determinado material, quanto a possibilidade de desenvolver reatividade biológica a nível celular (ROGERO et al., 2003).

Em função das possíveis alterações que o processo empregando ozônio possa acarretar a materiais, polímeros e biomateriais, principalmente tendo em vista a superfície dos mesmos, com impacto na sua biocompatibilidade, faz-se necessária a avaliação o grau de comprometimento da segurança biológica dos materiais expostos quanto à citotoxicidade. O método de difusão em ágar revela-se então adequado para proceder a esta avaliação e está descrito em compêndios oficiais e normas internacionais (ISO, 1999; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2015), apresentando como vantagem a sensibilidade, facilidade na execução, reprodutibilidade, baixo custo, além de atender à tendência mundial de suprimir o uso de modelos animais experimentais (ROGERO et al., 2003).

O termo cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular através de

desagregação enzimática, mecânica ou química (FRESHNEY, 1987). Os fibroblastos são amplamente utilizados como tipo celular devido ao seu fácil isolamento e cultivo (RAAB et al., 2014).

2.4.2. Processo de despirogenização (endotoxina)

É adicionalmente fundamental, nas aplicações mencionadas relativamente ao paciente que se tenha segurança quanto a níveis máximos ainda seguros de endotoxinas bacterianas.

Assim, além de se assegurar a esterilidade, a biocompatibilidade, busca-se, em tais produtos, a garantia quanto a pirogenicidade traduzida por níveis máximos seguros de endotoxinas. Os pirogênios são heterogêneos e apresentam composição e estrutura variável que influenciam os efeitos biológicos como febre, mudança no quadro leucocitário e choque séptico (HENDERSON et al, 1996; RIETSCHER et al, 1994).

Entre as diferentes possíveis fontes de pirogênio, a endotoxina bacteriana é a mais preocupante. Trata-se de um pirogênio exógeno, que induz à produção de pirogênio endógeno. O pirogênio endógeno é produzido pelo hospedeiro como resposta ao estímulo. Este pirogênio é de natureza proteica, sintetizado por diferentes células do hospedeiro, assim que exposta ao pirogênio exógeno. É considerado o mediador da febre (PINTO et al. 2015).

Os pirogênios exógenos levam a elevações térmicas ao serem injetados no homem ou no animal. A endotoxina (LPS, lipopolissacarídeo), é o de maior importância, mas existem outros produtos, que induzem, também, elevações de temperatura quando injetados (BARTH et al., 2007). Endotoxinas se constituem em complexos de alto peso molecular, associados à membrana externa de bactérias Gram (-) (PINTO et al. 2015).

O teste de endotoxina bacteriana é usado para detectar ou quantificar endotoxinas presentes em amostras para qual o teste é preconizado. O reagente empregado nesse teste consiste no extrato aquoso dos amebócitos circulantes do *Limulus polyphemus*, caracterizado como reagente LAL (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; REBELLO et al., 2012).

Sabe-se da independência dos atributos esterilidade e apirogenicidade, quando considerados os processamentos. Assim ocorre para autoclavação, tratamento com óxido de etileno e irradiação, que quando adequadamente aplicados esterilizam, porém não promovem a despirogenização, obtida por calor seco sob condições mais drásticas (TESSAROLO et al., 2006; MARSIT et al., 2017). Entretanto, a característica altamente oxidante do ozônio, responsável pela ação esterilizante, poderá potencialmente responder pela inativação de endotoxina bacteriana (OH et al., 2014)

Desta forma, se a necessidade de novas técnicas e metodologias com o intuito de esterilizar materiais sensíveis à alta temperatura, devido à demanda de produtos farmacêuticos e médico-hospitalares, seria já suficiente para o desejo de atender o processo empregando ozônio, ainda mais é atraente ao se considerar a possibilidade de simultaneamente constituir-se ao processo de despirogenização. Para a utilização apropriada desta tecnologia, é requerida a validação do processo, demonstrando a segurança na sua aplicação quanto a letalidade microbiana e inativação de endotoxina, tornando possível sua aplicação (OH et al., 2014; USP, 2016)

2.4.3. Estudo por espectroscopia no infravermelho com transformadas de *Fourier* com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR).

A espectroscopia de infravermelho é comumente utilizada para a identificação de materiais poliméricos. A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas. A frequência de maior utilidade está situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} (conhecido como infravermelho médio). A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (KAWANO, 2004; SILVERSTEIN et al., 2010)

Para que uma molécula absorva radiação no infravermelho é necessário que exista alteração do momento de dipolo elétrico como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional, resultando em absorção da energia radiante. As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais, que correspondem a um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação fazendo com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente, e deformações angulares, que apresentam as variações ritmadas de ligações que têm um átomo em comum ou o

movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem alteração das posições relativas dos átomos do grupo. (SILVA, 2008.; SILVERSTEIN et al., 2010, BARBES et al., 2014).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR), fornece importantes informações de grupos funcionais orgânicos presentes na estrutura de uma substância, na frequência entre 650 e 4000 cm^{-1} , podendo ser utilizada na identificação de um composto ou para a investigar sua composição química (ALISKA, 2010; ORREGO et al., 2010). É baseada no interferômetro de Michelson, ou seja, a radiação é dividida em dois feixes. Um deles permanece fixo (espelho fixo (M_1)) e o outro se move (espelho móvel (M_2)), ou seja, uma metade da radiação é transmitida e a outra metade é refletida. Este sistema, possui também, um espelho semi-refletor (*beamsplitter*) e uma fonte de radiação (Figura 2) (BARCELOS, 2015).

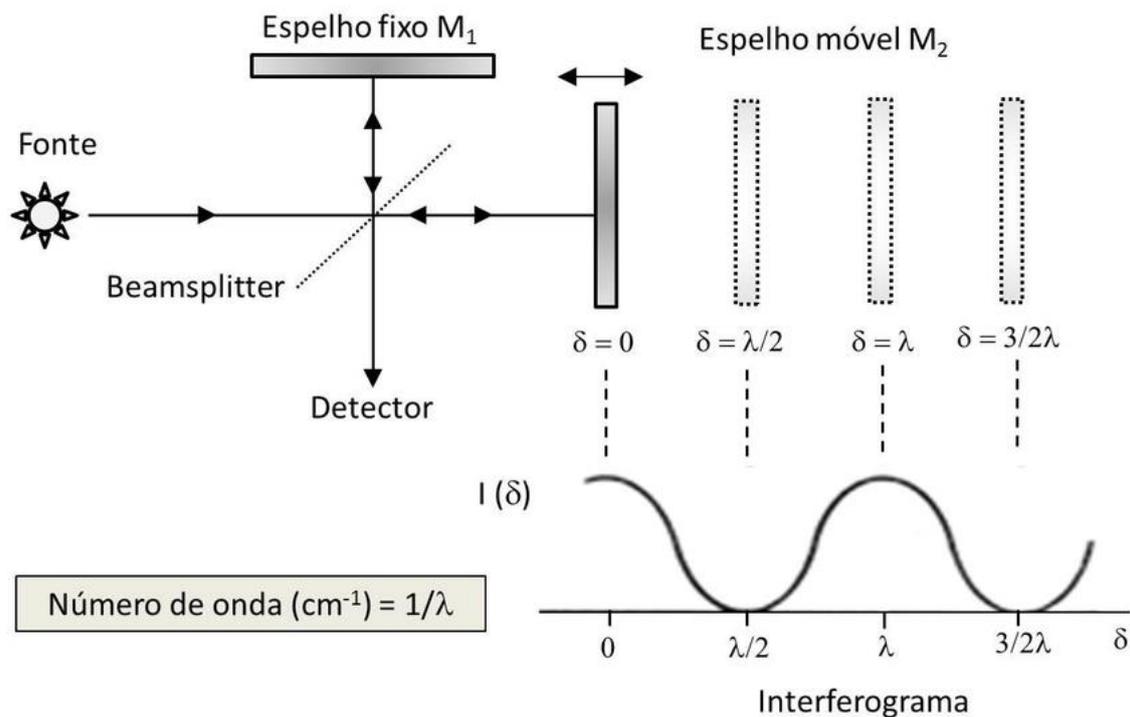


Figura 2: Diagrama mostrando os principais componentes de um espectrômetro FTIR (BARCELOS, 2015)

Este fator permite a obtenção de espectros com menos ruídos, pois a variação da distância percorrida pelos dois feixes, proporciona uma sequência de interferências construtivas (energia máxima que chega ao detector) e destrutivas (energia mínima que chega ao detector) e, conseqüentemente, variações na intensidade de radiação

recebida pelo detector fotossensível que irá captar o sinal luminoso, o qual será convertido em um espectro de absorção óptica infravermelha, correspondendo a intensidade de absorção (ou absorbância) em função do número de onda, transformando-o em um interferograma (Ver Figura 2) (ALISKA, 2010; BARCELOS, 2015; SILVA, 2008; SILVERSTEIN et al., 2010).

A técnica de reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica utilizada para se obter espectros no infravermelho de amostras que não podem ser analisadas pelos métodos convencionais, como pastilhas de KBr e filmes. A amostra, líquida ou sólida, é colocada em contato com um elemento de reflexão interna de alto índice de refração, sem tratamento prévio. A ATR tem como princípio a reflexão total da energia a partir da incidência da radiação no material com alto índice de refração, a qual aumenta sob determinado ângulo. A luz infravermelha refletida pelo prisma consegue interagir com a superfície da amostra e nas frequências em que tal material absorver energia ocorre a atenuação do feixe a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho (também denominada atenuação do campo evanescente), responsável pela geração do espectro. (FAHRENFORT, 1961; LUZ, 2003; SILVA, 2008).

Por essas características, a FTIR tem sido usado amplamente para a identificação de compostos orgânicos derivados do processo de degradação em materiais poliméricos (URBANIÁK-DOMAGALA, 2012). As reações de oxidação, em polímeros, levam a formação de diferentes grupos químicos ligados à cadeia polimérica, os principais são os hidroperóxidos e as cetonas (PAOLI, 2008). A vibração da ligação C=O de cetonas (estiramento) aparece no espectro de IR com banda intensa, em uma região onde a maioria dos polímeros não absorve, por volta de 1700 cm^{-1} , já a formação de carbonila O-H, dos hidroperóxidos, surgem na região de 3500 cm^{-1} (NGUYE et al., 2015, FAHRENFORT, 1961). Em um estudo realizado, observou-se que o ozônio úmido pode reagir facilmente com as ligações duplas entre carbonos, através da clivagem dessas ligações, levando a formação de grupo carbonila (GOTO et. al., 2010).

A estabilidade do polietileno (PE) diminui acentuadamente na presença de oxigênio, o qual promove o rápido desenvolvimento do processo oxidativo que essencialmente diminui a propriedade mecânica do PE (PETERSON et. al., 2001).

O processo de oxidação é complexo, não apenas pelo ponto de vista químico, mas, também, pelo físico-químico (GUGUMUS, 2002). Estudos sobre o mecanismo

de oxidação de polietileno mostraram que os hidroperóxidos são seus produtos primários, os quais então se decompõem para formar outros compostos contendo oxigênio. A iniciação da oxidação pode ocorrer com a formação de radicais R ou R-O₂. Os radicais formados atacam os grupos C-H para produzir hidroperóxidos (CROMPTON, 2010).

As reações com a participação de grupos hidroperóxido causam a clivagem da cadeia molecular, isto é, a degradação do polímero. Além disso, mudanças estruturais associadas à ramificação, reticulação e ciclização de macromoléculas ocorrem na auto-oxidação de polialcenos. No entanto, esses processos são típicos apenas de polímeros com ligações duplas, enquanto que as macro-cadeias saturadas (particularmente as que contêm grupos laterais) estão sujeitas a degradação (GUGUMUS, 2002).

Estudos extensos de IR foram realizados em PE oxidado. A espectroscopia de absorção de IR tem sido amplamente utilizada para determinar os produtos de oxidação e a taxa de formação desses produtos durante a degradação térmica ou foto-oxidação do PE (NGUYE et al., 2015; RUGG et al., 1954).

O espectro de PE puro, apresenta modo de vibrações características: estiramento de C-H próximo a 2950 cm⁻¹, modo tesoura ou dobramento angular próximo a 1460 cm⁻¹ (CH₂) e modo de vibração de rotação de CH₂ em 720 cm⁻¹ (KILIC et al., 2017).

Em um estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2008), amostras de *blends* de polietileno com amido modificado foram analisadas por FTIR após serem expostas a radiação gama, tem sido observadas alterações ou formação de novos grupos orgânicos. Houve alteração nas bandas em ~1715-1740 cm⁻¹, correspondentes aos grupos carbonila (C=O), e em ~1620-1680 cm⁻¹, caracterizando os grupos vinil (C=C). Tais ocorrências podem ser consideradas consequências inerentes ao tratamento do material com radiação ionizante, que leva à formação de reativos intermediários, radicais livres, íons e átomos em estados agitados, os quais podem seguir reações que resultam em rearranjos ou na formação de novos compostos orgânicos.

Quando tratado com gás seco de ozônio sob diferentes temperaturas, o PE demonstrou espectro com bandas em ~1100 e 1720 cm⁻¹, as quais foram atribuídas ao alongamento C-O e C=O, respectivamente, decorrentes de processo oxidativo (KUMAGAI et al., 2007).

A exposição prolongada de PE ao ozônio resulta em radicais hidroperóxidos, os quais sofrem rearranjo resultando, possivelmente, em aldeídos, cetonas e ácidos, conforme esquema na Figura 3 (MURAL et al., 2017).

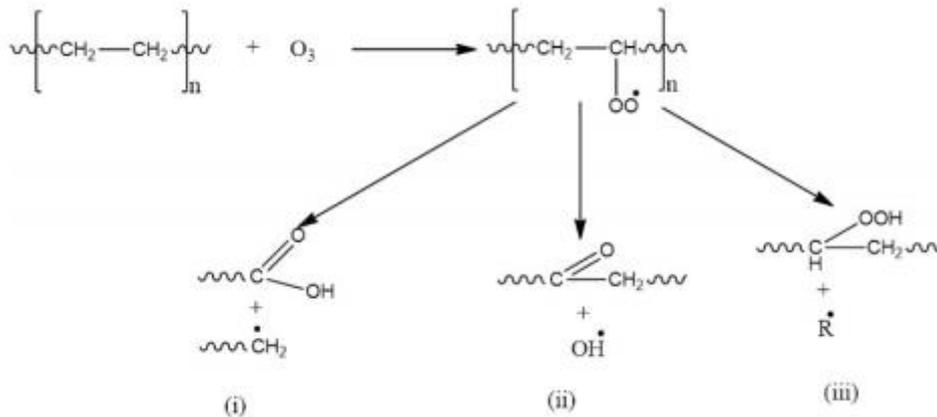


Figura 3: Possível esquema de reação do ozônio com produtos à base de polietileno (MURAL et al., 2017).

A presença de oxigênio ocasiona aumento na concentração de radicais livres produzidos durante a degradação do polímero. Em vários casos, a degradação de polímeros contendo cloro, como o policloreto de vinila (PVC), pode levar a liberação de cloreto de hidrogênio (HCl), com formação de sequencias poliênicas e ligações cruzadas na cadeia (RODOLFO Jr; MEI, 2007).

O padrão espectral do PVC sem tratamento, apresenta as bandas de absorção entre $2962\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$ (estiramento, $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}$), 1430 cm^{-1} (deformação δ , $-\text{CH}_2-$), $1330\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ (deformação δ , $-\text{CH}$ em $-\text{CHCl}-$), $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (absorção de propostas no plano de anéis aromáticos, $-\text{C}-\text{C}-$), 962 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$) e entre $690\text{-}615\text{ cm}^{-1}$ (estiramento, $\text{C}-\text{Cl}$) (KUMAGAI et al., 2007; BAOYING et al., 2009; DEL CARPIO, 2009)

Em estudo na qual se avaliou, por FTIR, diferentes condições de foto-oxidação do PVC, obteve-se as mesmas variações espectrais de absorvância na faixa de $1600\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$, correspondendo as grupos: dupla ligação, $\text{C}=\text{C}$ (entre 1600 e 1680 cm^{-1}), carbonila ($160\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$), assim como a formação do grupo carbonila ao redor da ligação $\text{C}-\text{Cl}$ ($1730\text{-}1820\text{ cm}^{-1}$) (REAL et al., 2008). Essas ligações duplas entre carbonos em polímeros de PVC, pode corresponder a estruturas internas características de $\langle \text{CH}=\text{CH}-\text{CHCl} \rangle$ devido a formação de ligações conjugadas por

processo de desidrocloreção do PVC e, neste caso, a estrutura do grupo terminal passa a ser $\langle\text{CH}=\text{CHCl}\rangle$ ou $\langle\text{CCl}=\text{CH}_2\rangle$ (ABDULIN et al., 1978; RODOLFO Jr; MEI, 2007).

No mesmo trabalho, anteriormente mencionado, em que Kumagai e colaboradores avaliam o efeito do ozônio em polímeros a base de polietileno, também foram analisadas as possíveis reações com PVC, e, neste caso, não foi observado nenhuma mudança significativa na superfície do material, após longo tempo de tratamento com ozônio. (KUMAGAI et. al., 2007).

Outro material polimérico estudado foi o elastômero de silicone, o qual é caracterizado por um esqueleto inorgânico de ligações Si-O-Si. Grupos orgânicos (exemplo, metil e etil), potencialmente, podem se ligar ao átomo de silício (Si-C) (OZÇAM et al., 2014).

Em estudos de processos de esterilização com ozônio e radiação UV não houve alteração na superfície interna dos tubos de silicones analisados, foram observadas bandas de CH_3 , Si_2O e SiC (KITAZAKI et al., 2014).

Ozçam e equipe (2014), analisaram o efeito da radiação ultravioleta com ozônio (UVO) na superfície de polidimetil siloxano (PMDS) em diferentes tempos de contato. Detectou-se a origem de grupos hidrofílicos na superfície do silicone, incluindo hidroxila, ácido carboxílico, aldeído, peróxidos, entre outros. Em tempo mais longos de exposição ao UVO, houve aumento no sinal Si-O-Si ($1055\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$), R-OH ($3050\text{-}3040\text{ cm}^{-1}$) e Si-OH ($875\text{-}920\text{ cm}^{-1}$). Não foi observado indício de alteração nos sinais correspondentes ao grupo metil, CH_3 ($785\text{-}815$, $1245\text{-}1270$ e $295\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$) presente no esqueleto do polímero, entendendo-se que devido à alta estabilidade deste grupo, as alterações tendem a ser muito mais lentas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia e aplicabilidade do processo de esterilização empregando ozônio, sob temperaturas compatíveis com materiais termossensíveis, com vistas à segurança do paciente. Constituíram-se objetivos específicos deste projeto:

- 1) Desenvolvimento de Processo de Esterilização empregando protótipo de equipamento (Ortosíntese®) e sistema (Brasil Ozônio®).
- 2) Determinar valores D para o processo de esterilização, considerando esporos de *Geobacillus stearothermophilus*.
- 3) Investigar a eficácia do processo de esterilização por ozônio, considerando seringas hipodérmicas e formas tubulares distintas na constituição de monitores biológicos.
- 4) Avaliar a biocompatibilidade dos materiais submetidos ao processo de esterilização.
- 5) Investigar o potencial de despirogenização proporcionado pelo processo.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O objeto de estudo deste trabalho está vinculado à tecnologia desenvolvida de esterilização por ozônio e materiais ou dispositivos submetidos à mesma.

4.1.1. Equipamento, sistema e processo de esterilização por ozônio

A empresa BrasilOzônio® em parceria com a Ortosíntese® desenvolveu um protótipo de um esterilizador (Figura 4 e 5), utilizando o ozônio como agente esterilizante.



Figura 4: Vista frontal da Autoclave Ozônio – porta fechada.

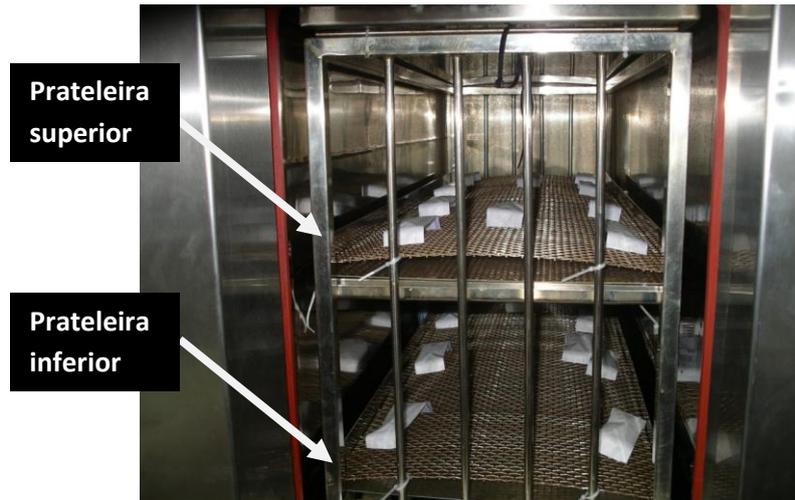
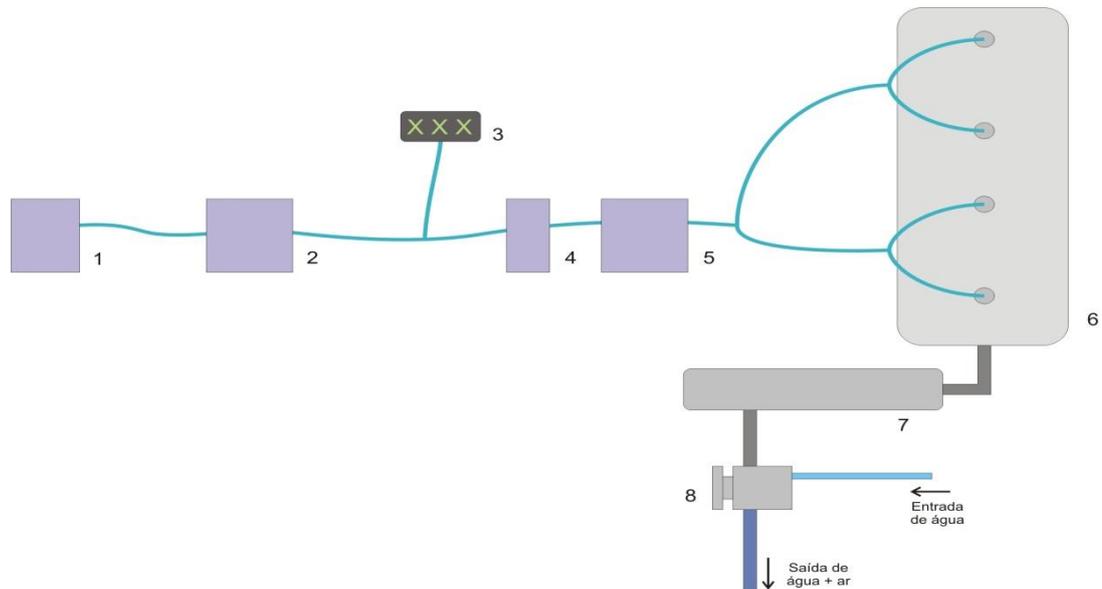


Figura 5 - Vista interna da Câmara de Esterilização Autoclave Ozônio com dispositivos testes acomodados nas prateleiras.

O equipamento Esterilizador por Ozônio desenvolvido para a realização deste estudo é composto de: câmara de esterilização, dispositivo gerador de ozônio, reator, destruidor de ozônio e sistema de vácuo para movimentação do ozônio na câmara de esterilização. O processo desenvolvido, sob condições controladas, inicia com o encaminhamento do oxigênio concentrado para geradores de ozônio. O ozônio gerado passa por reator, sendo em seguida encaminhado para a câmara de esterilização, na qual foram, quando pertinente, previamente alocados materiais e suportes destinados aos desafios microbianos, conforme etapa em questão. Após o preenchimento da câmara, e decorrido o tempo de contato planejado entre agente esterilizante e materiais, o ozônio é retirado e destruído, ou seja, convertido a oxigênio.

A Figura 6 apresenta o fluxograma esquemático do sistema de esterilização com câmara apresentando capacidade de 125 litros.



1. Alimentação de oxigênio
2. Geradores de Ozônio BRO3
3. Medidor de ozônio
4. Reator
5. Câmara esterilizadora
6. Destruidor de ozônio
7. Sistema de vácuo
8. Saída de água e ar

Figura 6 – Fluxograma Esquemático do Sistema de Esterilização a Base de Ozônio

Após calibrados os dispositivos de dimensionamento de temperatura, umidade relativa e concentração de ozônio na câmara, procedeu-se a estudos para desenvolvimento e validação do processo de esterilização. Trabalhou-se com réplicas de três ciclos para cada combinação de parâmetros com a câmara contendo exclusivamente os microrganismos (forma vegetativa ou esporulada), vinculados em suportes. Na sequência, testes com a câmara preenchida com materiais em adição aos microrganismos.

Os desafios seguiram diferentes tempos de exposição ao ozônio (Tabela 1), os quais foram representados por pulsos, conforme Figura 7, (vácuo, preenchimento da câmara, tempo de patamar e vácuo), sob concentração acima de 7 g/Nm^3 , umidade relativa entre 80 e 95%, e temperatura ambiente.

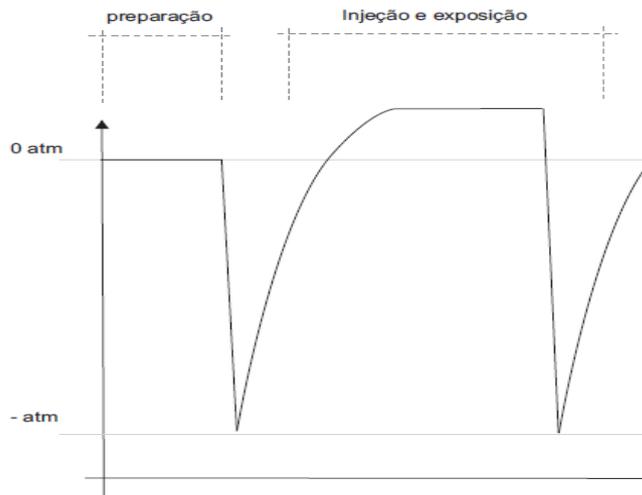


Figura 7: Esquema representando um pulso com vácuo, preenchimento da câmara com ozônio, patamar (exposição do gás) e vácuo.

Tabela 1: Tempo de exposição em condições físicas constantes de esterilização por ozônio em minutos (min) representado por pulsos.

Pulsos	Tempo exposição ao ozônio (min)
1	20
2	40
3	60
4	80
5	100
6	120
7	140
8	160

4.2. Métodos

4.2.1. Estudo com microrganismos na forma vegetativa

Com o intuito de avaliar a ação esterilizante do ozônio frente a diferentes microrganismos na forma vegetativa, foram preparadas e padronizadas de forma asséptica em capela de fluxo laminar, suspensões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (7×10^6 UFC/ mL), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 9027) (38×10^6 UFC/ mL), *Escherichia coli* (ATCC 8739) (8×10^5 UFC/ mL), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (20×10^6 UFC/ mL), *Salmonella* (ATCC 13311) (3×10^6 UFC/ mL), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) (4×10^5 UFC/ mL) e *Candida albicans* (ATCC 10231) (2×10^6 UFC/ mL) em solução fisiológica estéril (cloreto de sódio 0,9 %) (Figura 8).

Destas suspensões, alíquotas de 200 μ L foram transferidas para tiras de papel de filtro estéril e, em ambiente controlado, deixadas por aproximadamente 4 horas para secagem em temperatura ambiente. Foram preparadas 30 tiras para cada um dos microrganismos. Em seguida, as tiras de papel de filtro impregnadas foram armazenadas, individualmente, em placas de Petri estéril.

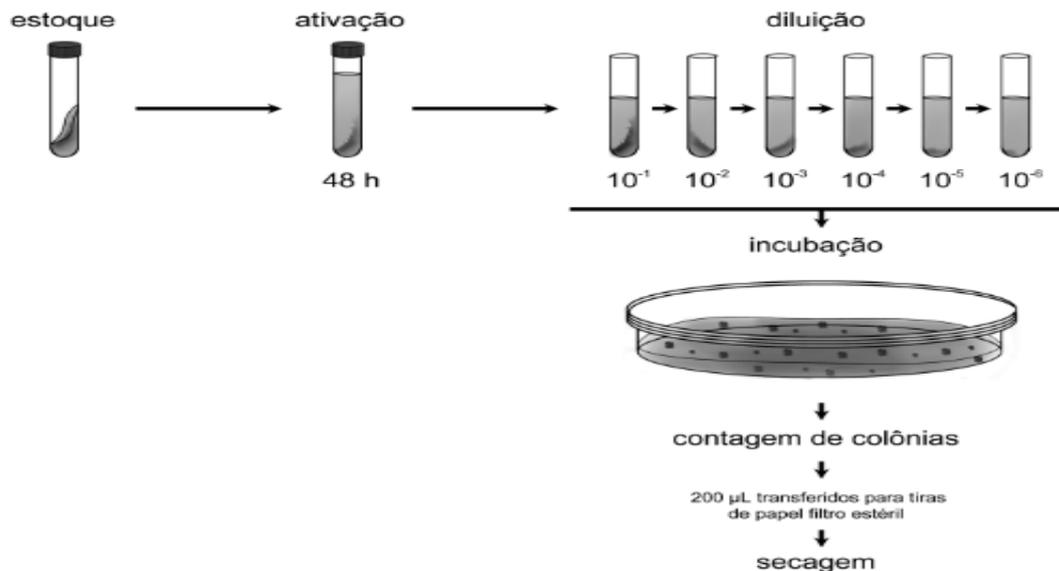


Figura 8: Esquema de preparo e padronização dos microrganismos na forma vegetativa.

As placas de Petri contendo tiras de papel impregnadas com os microrganismos constituíram-se nos agentes submetidos ao desafio. Assim, três placas com tiras de papel inoculadas, de cada um dos microrganismos, foram submetidas a contagem microbiana pelo método de semeadura de profundidade (*Pour Plate*) sem terem sido desafiadas, configurando o controle. Para tal procedimento, em condições assépticas, cada uma das tiras de papel, impregnadas com distintos microrganismos, foi retirada da placa de Petri e transferida, individualmente, para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução fisiológica a 0,9 % com pérolas de vidro, previamente estéril, e submetida a agitação vigorosa até dispersão das fibras celulósicas da tira. Em seguida, alíquota de 1 mL foi transferida para outro tubo de ensaio com 0,9 mL de solução fisiológica a 0,9 %, seguido de diluições seriadas até 10^{-6} . Para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), volumes de 1 mL de cada uma das diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}), foram transferidos, em triplicatas, para placas de Petri. Posteriormente, em cada uma das placas, foi adicionado 20 mL de meio Ágar Triptona Soja (TSA, Difco®) e homogeneizado. Após solidificação, as placas foram incubadas em posição invertida, por 48 horas a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ e submetidas a contagem de UFC.

Em cada pulso esterilizante (Ver Tabela 1), outras 3 placas com tiras de papel inoculadas, de cada um dos microrganismos, foram desafiadas. Ou seja, 3 placas, de cada microrganismo, foram submetidas a 1 pulso, outras 3 placas de cada microrganismo a 2 pulsos, e assim, sucessivamente até 8 pulsos. Após passarem pelo agente esterilizantes, as tiras de papel foram tratadas conforme procedimento descrito acima.

O cálculo do valor D, de cada um dos microrganismos, foi realizado com a média da triplicata dos resultados em função do tempo necessário para redução de 6 logaritmos (10^6) (PINTO et al., 2015)

4.2.2. Estudo com microrganismo na forma esporulada

Utilizou-se como indicador biológico (IB) esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), obtidos em apresentação comercial do tipo autocontido, fornecido pela empresa 3M® (Lote: 201409JA / Carga microbiana: $3,2 \times 10^6$ esporos/ unidade), como indicativo de esterilização. Após a submissão aos pulsos

esterilizantes empregando ozônio, tratou-se os IB de forma a permitir o contato entre meio de cultura e esporos, e a seguir procedeu-se a incubação dos mesmos em estufa (Marca: Fabbe Primar / Modelo: 219) a $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e avaliação dos mesmos quanto a viabilidade microbiana. Triplicata de IB não desafiados foram utilizados como controle.

Foi avaliado como variável o tempo de ação do ozônio, o qual é retratado pelo pulso do processo de esterilização, sempre empregando réplicas de no mínimo 3 ciclos para combinação de parâmetro de IB de esporos *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Os demais parâmetros dos ciclos foram mantidos, sem variação.

4.3. Desenvolvimento do processo de esterilização.

A etapa de desenvolvimento do processo de esterilização empregando o protótipo de um esterilizador por ozônio contemplou estudos com a câmara vazia. Foi avaliado como variável o tempo de ação do ozônio, o qual é retratado pelo pulso do processo de esterilização, e mantidos constantes os parâmetros físicos, os quais sejam a concentração do ozônio (7 g/Nm^3), umidade relativa entre 80 e 95%, e temperatura ambiente.

Os Indicadores Biológicos usados para este estudo foram do tipo autocontido com esporos *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, comercializados pela Empresa 3 M®.

A câmara de esterilização foi geograficamente subdividida em regiões, sendo que foram posicionados cinco IBs em cada um de cinco pontos distintos na prateleira inferior e mais cinco IBs em cada um de outros cinco pontos distintos na prateleira superior (Figura 9), totalizando 50 IBs por pulso representativo de cada combinação de parâmetros. Cada uma das situações de pulso (Ver Tabela 1) foi efetuada em triplicata. Portanto, trabalhou-se 24 pulsos e 1200 IBs foram avaliados.

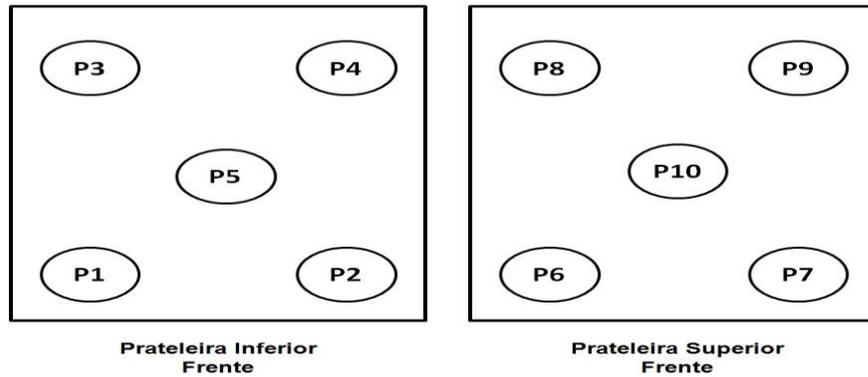


Figura 9: Esquema de distribuição dos Indicadores Biológicos (*Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953) em 10 diferentes pontos (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10), no interior da câmara do esterilizador a ozônio.

Esta etapa de desenvolvimento permitiu a definição do meio ciclo e ciclo completo do processo de esterilização. Assim como, com base na letalidade dos IBs foi determinado o Valor D empregando para tanto o método quantal ou fração negativa (método Stumbo-Murphy-Cochran).

4.3.1. Estudo da detecção de letalidade microbiana

4.3.1.1. Método qualitativo (fração negativa)

Após a submissão aos ciclos esterilizantes empregando ozônio, tratou-se os IBs de forma a permitir o contato entre meio de cultura e esporos, e a seguir procedeu-se a incubação dos mesmos em estufa a $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e avaliação dos mesmos quanto a viabilidade microbiana. Três IBs sem passar pelo processo de esterilização foram utilizados como controle positivo. Os resultados obtidos quanto à letalidade, qualitativos, foram caracterizados pela alteração de coloração do indicador de pH contido na estrutura do IB. Conforme orientação do fabricante, considerou-se positivo (crescimento microbiano) quando houve mudança na coloração do meio para cor amarela.

4.3.1.2. Método quantitativo (enumeração direta)

Após a exposição dos IBs ao ozônio, sob condições assépticas, as tiras de papel impregnadas com esporos foram retiradas do interior dos IBs e transferidas, individualmente, para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução fisiológica a 0,9 % e submetidas a agitação vigorosa com pérolas de vidro, até dispersão das fibras celulósicas da tira. Os tubos foram submetidos ao choque térmico em banho-maria a 60 °C durante 10 minutos, a fim de ativar os esporos, e em seguida, sofreram resfriamento em banho de gelo. Posteriormente, a alíquota de 1 mL foi transferida para outro tubo de ensaio contendo 9mL de solução fisiológica a 0,9 % , seguido de diluições seriadas. Volumes de 1mL de cada uma das três últimas diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), foram transferidos para placas de Petri, em triplicata, para contagem de colônias. Foi adicionada nas placas de Petri com as alíquotas de 1 mL da suspensão, o meio para contagem *Plate Count Agar* (PCA) e homogeneizado, seguindo incubação por 48 horas a 56 °C. A contagem do número de esporos sobreviventes foi realizada com o auxílio de um contador de colônias.

4.4. Cálculo do valor D.

Com base nos resultados obtidos pela detecção de letalidade por fração negativa, o cálculo do valor D foi realizado pelo método Stumbo, Murphy e Cochran, o qual requer um ou mais dados na fase quantal, usando modelo semi-logarítmico (PINTO et al., 2015):

$$D = \frac{U}{\log \left(\frac{N_o}{2,303 \log \left(\frac{n}{q} \right)} \right)}$$

Onde:

D = Valor D.

U = Tempo de aquecimento a uma temperatura específica.

N_0 = Número inicial de microrganismos em cada réplica.

n = Número total de réplicas.

q = Número negativo de réplicas.

4.5. Desafio com produto simulado (monitores)

4.5.1. Seringas de polipropileno de 3 mL

Com o objetivo de criar um desafio ao processo de esterilização, foram introduzidas no interior de seringas de 3 mL, tiras de papel impregnadas com a carga de 10^6 de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, como monitor biológico. Foram utilizadas tais seringas, de forma a permitir avaliação da letalidade das tiras introduzidas no interior das mesmas.

A preparação dos monitores constituiu na transferência individual, sob condições assépticas, das tiras impregnadas com esporos do interior dos IBs, para o interior de seringas. Estas foram, a seguir, embaladas e submetidas ao processo, conforme condições preconizadas para ciclos letais e sub-letais ou meio ciclo de esterilização.

Considerou-se em cada uma das posições da câmara, para cada tipo de ciclo, duas situações de desafio, constituídas por duas seringas, sendo uma sem a agulha e a outra com a agulha e respectivo protetor. As duas situações de desafio foram posicionadas em cada um de seis diferentes posições da câmara, sendo três na prateleira inferior e três na superior (Figura 10). Os ciclos caracterizados por tempo correspondente a meio ciclo e a ciclo completo de esterilização foram desenvolvidos em triplicatas.

As demais condições, exceto o tempo, foram idênticas àquelas anteriormente empregadas no estudo para detecção de letalidade microbiana em IB. Após cada ciclo, em capela de fluxo laminar, as embalagens das seringas foram abertas e as tiras impregnadas com esporos foram removidas e transferidas para tubos de ensaio

contendo 10 mL de caldo triptona de soja (TSB, Difco®), sendo então incubados por até 14 dias a $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os tubos foram então avaliados, e as amostras analisadas, diariamente, individualmente quanto à turbidez, para avaliar possível crescimento microbiano.

Em cada conjunto de testes, um tubo contendo 10 mL do caldo TSB estéril, sem a tira de esporos, foi utilizado como controle negativo e outro tubo com a tira sem sofrer o processo de esterilização, como controle positivo.



Figura 10: Distribuição na câmara do Esterilizador por Ozônio dos desafios com seringas de polipropileno de 3 mL.

4.5.2. Desafio com estruturas canuladas (monitores com formas tubulares)

Estudos adicionais foram realizados com outros desafios biológicos, compostos por cânulas de silicone e de aço inoxidável que variam entre 45 e 70 cm de comprimento, de acordo com o diâmetro (0,5 mm x 45 cm; 1 mm x 50 cm; 2 mm x 57,5 cm; 3 mm x 65 cm e 4 mm x 70 cm) (Figura 11), com a finalidade de avaliar a difusibilidade do ozônio suficiente para garantir a eficácia da esterilização. Tais canulados, foram utilizados de forma a permitir avaliação da letalidade das tiras impregnadas com carga de 10^6 de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 introduzidas no interior dos mesmos.

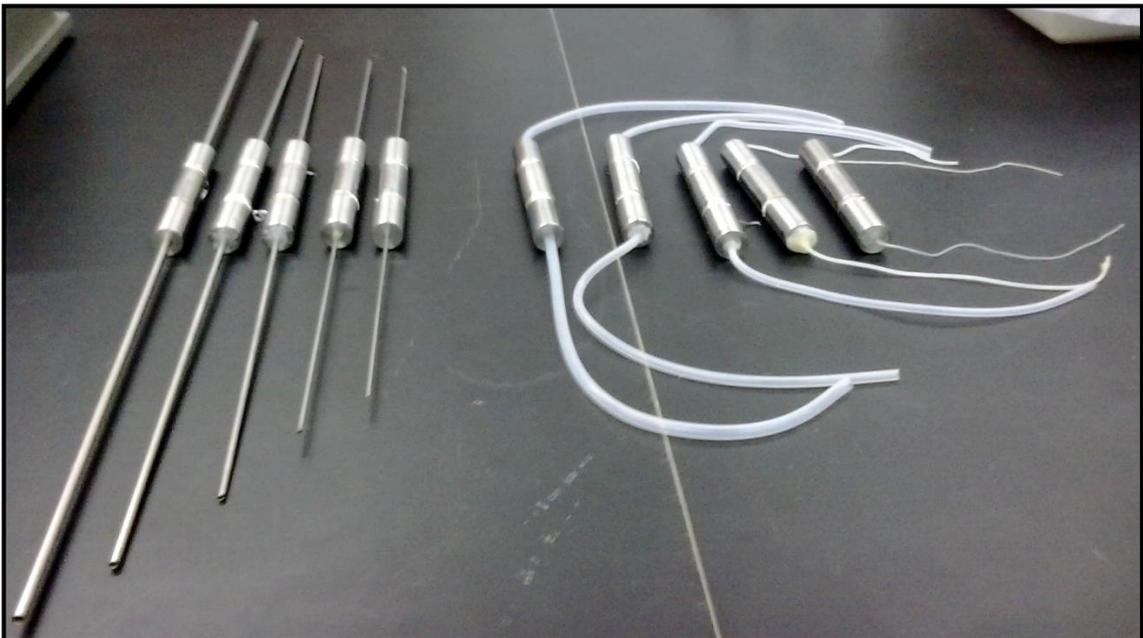


Figura 11: Estruturas de canulados composto por aço inoxidável e silicone que variam entre 45 e 70 cm de comprimento, de acordo com o diâmetro (0,5 mm x 45 cm; 1 mm x 50 cm; 2 mm x 57,5 cm; 3 mm x 65 cm e 4 mm x 70 cm).

A preparação dos monitores constituiu na abertura das extremidades do IB autocontido da 3M® (Figura 12), a fim de permitir o contato do esterilizador a base de ozônio com a tira impregnada de esporos, cada uma das quais foram transferidas individualmente, sob condições assépticas, para o interior dos canulados (Figura 13 e 14). Em seguida, cada uma das unidades desafio foi embalada, com papel grau

cirúrgico, individualmente tendo ao lado um IB do tipo autocontido. Sendo assim, os canulados foram embalados com dois indicadores biológicos: um no interior do sistema canulado (IB interno) e outro externo ao sistema canulado, porém no interior da embalagem (IB externo). Os canulados de aço inoxidável foram embalados em posição retilínea (Figura 15) e os com estrutura de silicone, em posição curvada (Figura 16). Ambas foram distribuídas, intercaladamente, no interior da câmara do esterilizador a base de ozônio (Figura 17).



Figura 12: IB aberto nas extremidades.

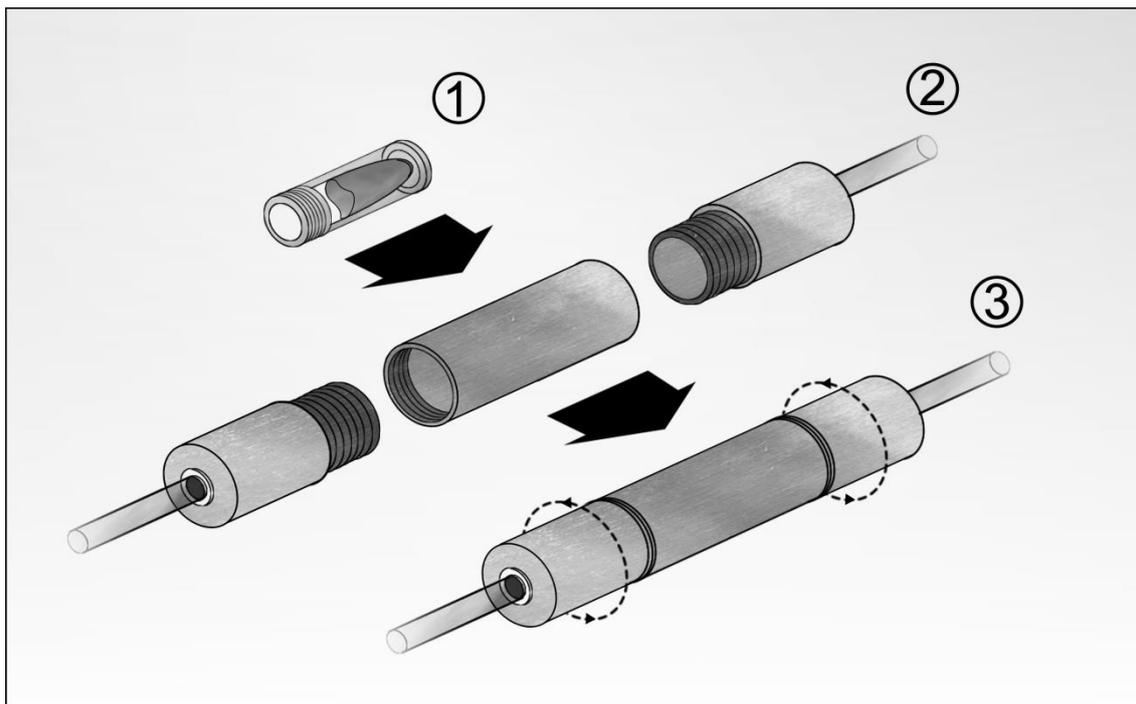


Figura 13: Adição de Dispositivo contendo tiras de papel impregnadas com carga de 10^6 de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 nos desafios canulados.

Legenda: 1 – Dispositivo contendo tiras de papel impregnadas com carga de 10^6 de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953; 2 – Adição do dispositivo na região mediana do comprimento da estrutura canulada; 3 – Estrutura selada hermeticamente.



Figura 14: IB introduzido no interior do canulado de silicone, representando o monitor biológico.



Figura 15: Canulado de aço inoxidável, utilizado como monitor biológico, embalado com papel grau cirúrgico juntamente com o IB.



Figura 16: Canulado de silicone, utilizado como monitor biológico, embalado com papel grau cirúrgico juntamente com o IB.



Figura 17: Distribuição, intercaladamente, de um mesmo comprimento e diâmetro dos monitores biológicos de canulados de aço inoxidável e silicone, dentro da câmara do esterilizador a base de ozônio.

Cada comprimento e diâmetro dos canulados, compostos tanto por aço inoxidável quanto por silicone, foram submetidos ao processo, em triplicata, conforme condições preconizadas para ciclos letais e sub-letais ou meio ciclo de esterilização.

Foram realizados testes qualitativos, por método de fração negativa, com três canulados de silicone e de aço inoxidável de cada comprimento e diâmetro, assim como testes quantitativos, pela metodologia de semeadura de profundidade, com outros três canulados com cada uma das especificações, tanto aos submetidos ao meio-ciclo quanto ao ciclo completo (letal) do processo.

Nos testes qualitativos, após cada ciclo, em capela de fluxo laminar, as embalagens dos canulados foram abertas e as tiras impregnadas com esporos no interior dos desafios, foram removidas e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo triptonsoja (TSB, Difco®), sendo então incubados por até 14 dias a $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os tubos foram então avaliados, e as amostras analisadas diariamente e individualmente quanto à turbidez, para observar possível crescimento microbiano (Figura 18). Os IBs autocontidos que estavam externos aos canulados foram

pressionados, de forma a permitir o contato entre meio de cultura e esporos, e a seguir procedeu-se a incubação dos mesmos em estufa a $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Conforme orientação do fabricante, considerou-se positivo (crescimento microbiano) quando houve mudança na coloração do meio para cor amarela.

Em cada conjunto de testes, um tubo contendo 10 mL do caldo TSB estéril, sem a tira de esporos, foi utilizado como controle negativo e outro tubo com a tira sem sofrer o processo de esterilização, como controle positivo.



Figura 18: Análise qualitativa dos monitores biológicos em caldo TSB.

No teste quantitativo, após a exposição dos IBs ao ozônio, sob condições assépticas, as tiras de papel impregnadas com esporos foram retiradas do interior dos IBs, transferidas individualmente, para tubos de ensaio contendo 10mL de solução fisiológica a 0,9 % e submetidas a agitação vigorosa em vórtex com pérolas de vidro, até dispersão das fibras celulósicas da tira. Os tubos foram submetidos ao choque térmico em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos e em seguida, resfriamento em banho de gelo.

Foram realizadas sucessivas diluições (10^{-1} a 10^{-3}) para cada tira correspondente e posterior plaqueamento por semeadura de profundidade, em duplicata, com meio de cultura TSA para contagem de colônias, seguindo incubação por até 14 dias a $54\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O mesmo processo foi realizado com uma tira de papel impregnada de esporos sem passar pelo processo de esterilização, e esta foi utilizada como controle positivo.

4.6. Estudo de Citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em ágar

As avaliações *in vitro* foram realizadas pela análise de citotoxicidade em culturas celulares, tomando como parâmetro a viabilidade celular, e utilizando o método de difusão em ágar.

Os ensaios foram desenvolvidos no Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL), utilizando a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), células de fibroblastos, sendo que todo trabalho foi desenvolvido empregando material estéril, bem como técnicas assépticas.

O cultivo e a manutenção foram feitos em meio mínimo de Eagle (MEM), o qual foi preparado e suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10 % soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM c/ 10 % SFB) a 36 °C, em garrafas de 75 cm² ou 250 mL com repiques a intervalos médios de 72 h. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,2 e versene 0,02 % (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas no seu respectivo meio de cultura e distribuídas, tanto nas garrafas destinadas a manutenção como em placas de Petri que foram utilizadas durante a realização dos ensaios (FRESHNEY, 1987; CRUZ, 2003; AZEVEDO, 2004).

Para a execução da avaliação, amostras de materiais médico-hospitalares (Figura 19), da empresa RWR Ind. E Com. de Equipamentos para Eletromedicina Ltda. (RWR®) e seus respectivos componentes polietileno (PE), poli (cloreto de vinila) (PVC) e silicone (Si), representadas na Tabela 2, foram fragmentadas com bisturi estéril em tamanhos aproximados de 0,5 cm x 0,5 cm e foram depositadas sobre a camada de ágar, antes de sua solidificação completa. As placas de Petri distintas (60 x 15 mm) foram incubadas novamente em estufa de 5 % de CO₂ a 37 °C por 24 horas.



Figura 19: Amostras de materiais médico-hospitalares: 1 – máscara infantil (silicone); 2 – conector (silicone); 3 – balão reservatório; 4 – máscara recém nato (silicone); 5 – umidificador (polietileno); 6 – traqueia (silicone) e 7 – máscara para macronebulização (policloreto de vinila).

As amostras foram avaliadas em triplicata, após exposição a 8 pulsos de ozônio, sendo utilizados como controles positivos fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro, respeitando a dimensão de 0,5 cm de diâmetro para ambos.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da amostra testada.

A graduação da citotoxicidade foi realizada conforme a orientação da USP 38ª edição (USP, 2015) e Farmacopeia Brasileira (2010), sendo consideradas tóxicas as amostras que apresentaram grau superior a 2. As farmacopeias descrevem ainda os diferentes índices de reatividade biológica, a saber:

- N=0: ausência de efeito sob a amostra (atóxico);
- N=1: ligeira alteração ou degeneração celular sob a amostra (leve reatividade);
- N=2: halo claro limitado somente sob a amostra (suave reatividade);
- N=3: halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra (moderada reatividade);

- N=4: halo claro maior que 1,0 cm ao redor da amostra (severa reatividade).

Tabela 2 – Materiais médico-hospitalares e seus respectivos componentes analisados quanto a citotoxicidade após submetidos ao processo completo de esterilização por ozônio, em triplicata.

Material/Componente	Quantidade analisada/ amostras
Máscara Recém Nato/ Silicone	3
Máscara Infantil/ Silicone	3
Máscara para Macronebulização/ PVC*	3
Conector/ Silicone	3
Umidificador/ Polietileno	3
Traqueia/ Silicone	3
Balão Reservatório/ Silicone	3

*PVC- Poli (cloreto de vinila)

4.7. Estudo por espectroscopia no infravermelho com transformadas de *Fourier* com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

A estrutura química das amostras de materiais médico-hospitalares (vide Tabela 2) foram analisadas através do Espectrofotômetro ATR-FTIR modelo Perkin-Elmer Spectrum 1000, na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

Os materiais foram analisados antes e depois de passarem até três vezes pelo processo de esterilização, e assim, comparadas os espectros com o intuito de observar se houve ou não alteração sofrido no material devido a ação do ozônio.

4.8. Estudo da eficácia do processo de despirogenização (endotoxina)

O teste de endotoxina bacteriana foi realizado pelo método quantitativo cinético cromogênico, o qual é baseado no tempo de reação requerido pela amostra para

alcançar uma absorvância específica. O tempo gasto para a reação é relacionado à quantidade de endotoxina, que é usado para a construção da curva padrão e posteriormente comparação com a amostra analisada (PINTO et al., 2015).

Para a realização desse teste, foram posicionados seis frasco de endotoxina do kit ECV (*Endotoxin Challeng Vials™*) do fabricante LONZA®, sendo três na prateleira inferior e mais três na prateleira superior (Figura 20), com a câmara vazia e em triplicata.



Figura 20: Distribuição na câmara do Esterilizador por Ozônio dos frascos contendo endotoxina bacteriana para teste de pirogênio.

Após o ciclo completo do processo de esterilização, os frascos para teste de endotoxina foram reconstituídos com 1,0 mL de água reagente LAL e agitados vigorosamente por 30 minutos. Em seguida, foram preparadas diluições a 10^{-1} e 10^{-2} para a realização do ensaio quantitativo de endotoxina pelo método cromogênico cinético, utilizando o Kit CHROMOGENIC LAL QCL™, do fabricante LONZA®.

Para este método, foi construída a curva padrão através de diluições dos padrões de endotoxina de *E. coli*, adquirindo as concentrações de 50,000; 5,000; 0,500; 0,050 e 0,005 EU/mL. Foram transferidos, em quadruplicata, 100 μ L das

concentrações de solução padrão as cavidades (poços) da microplaca tipo Elisa, assim como o branco (100 µL de água ultra pura utilizada para extração da amostra) e as soluções reconstituídas dos frascos submetidos ao processo de esterilização (amostras), assim como suas diluições, descritas acima (Figura 21). Em seguida, o LAL (Lisado de Amebócito *Limulus*) foi imediatamente reconstituído com água ultra pura e transferido em volumes de 100 µL em cada um dos poços contendo os padrões e as amostras. A microplaca foi introduzida no leitor específico com software WinKQCL®, procedendo-se ao ensaio e análise dos dados obtidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BC	BC	BC	BC	A10-2	A10-2	A10-2	A10-2	D10-1	D10-1	D10-1	D10-1
B	P1	P1	P1	P1	B	B	B	B	D10-2	D10-2	D10-2	D10-2
C	P2	P2	P2	P2	B10-1	B10-1	B10-1	B10-1	CP	CP	CP	CP
D	P3	P3	P3	P3	B10-2	B10-2	B10-2	B10-2	-	-	-	-
E	P4	P4	P4	P4	C	C	C	C	-	-	-	-
F	P5	P5	P5	P5	C10-1	C10-1	C10-1	C10-1	-	-	-	-
G	A	A	A	A	C10-2	C10-2	C10-2	C10-2	-	-	-	-
H	A10-1	A10-1	A10-1	A10-1	D	D	D	D	-	-	-	-

Figura 20. Esquema de distribuição das soluções padrões de endotoxina, nas concentrações de 0,005 EU/ mL (P1), 0,050 EU/ mL (P2), 0,500 EU/ mL (P3), 5,000 EU/ mL (P4) e 50,000 EU/ mL (P5); das soluções das amostras dos frascos reconstituídos de endotoxina esterilizados (A, B, C, D), assim como das suas diluições (A10⁻¹, A10⁻², B10⁻¹, B10⁻², C10⁻¹, C10⁻², D10⁻¹, D10⁻²) com controle negativo como o branco (BC) e controle positivo (CP).

4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As alterações morfológicas possivelmente encontradas nos esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 impregnado em tiras de celulose, após serem submetidas ao processo de esterilização por ozônio, foram avaliadas empregando Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM-FEG) modelo nova NANO SEM 400, fabricado por FEI *Company*, localizado no Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EPUSP).

Para este estudo, foram utilizadas 10 tiras de celulose impregnadas por esporos. Destas, cinco não passaram pelo processo de esterilização, sendo utilizadas como controle, e outras cinco foram submetidas ao processo, permitindo observar se houve alteração morfológica dos esporos em questão após serem submetidos ao processo de esterilização por ozônio.

Para uma melhor visualização, foi necessária metalização das amostras antes de submetê-las ao feixe de elétrons do SEM. Processo esse realizado por *sputtering* (pulverização catódica) com alvo de ouro.

Após a deposição de ouro, empregando equipamento marca Edwards, modelo “*sputter coater 5150B*” (Figura 22), as tiras foram posicionadas sobre o porta-amostras, permanecendo no interior do equipamento em região abaixo da coluna de vácuo.



Figura 22. Equipamento de deposição de ouro marca Edwards, modelo “*sputter coater 5150B*”.

Os procedimentos de aplicação de corrente elétrica e aceleração dos elétrons por diferença de potencial entre outros eletrodos foram realizados após o fechamento do compartimento da coluna e empregaram filamento de tungstênio na varredura das amostras. Seguem, abaixo, os parâmetros ajustados para as análises.

- Aumento: pelo menos até 80 K (variável para cada foto)
- Perímetro de Varredura: aproximadamente 3 μm
- Tensão Aplicada: 10 Kv

- Detector: elétrons secundários.
- Geração de Elétrons: filamento de tungstênio.
- Detector: everhardt-thornley (ETD).

RESULTADO E DISCUSSÃO

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

O ozônio é uma molécula natural gasosa, formado a partir de oxigênio e sua reação é reversível (BOCCI, 2005). Ou seja, o ozônio se decompõe espontaneamente e rapidamente se dissocia em oxigênio (SHARMA; HUDSON, 2008).

É um composto extremamente oxidativo, capaz de interagir com todos os metais, deslocar cadeias de hidrogênio e destruir diversos materiais orgânicos (BOCCI, 2005). O efeito antimicrobiano do ozônio ocorre através de um mecanismo que envolve a ruptura das membranas dos microrganismos, fator determinante para sua toxicidade (BOCCI, 1993; YAMAYOSHI; TATSUMI, 1993).

A eficácia da ação esterilizante do ozônio está também relacionada com o tempo de exposição ao gás, o qual é inversamente proporcional à concentração do O₃, umidade relativa e temperatura. (SAKURAI, 2003; BURANOV, 2005; USP, 2016).

O fato de ser altamente oxidativo torna o ozônio um agente esterilizante em potencial, além disso, a instabilidade do gás a qual leva a sua dissociação em oxigênio chama a atenção por não deixar resíduos no meio ambiente. Tais características induzem ao trabalho.

5.1. Desenvolvimento do processo de esterilização

5.1.1. Estudo com microrganismos na forma vegetativa

Com base nos parâmetros estabelecidos para este estudo, obteve-se eficácia de esterilização frente a diversos microrganismos na forma vegetativa. Para cada um dos microrganismos, foi calculado o valor D através da média da triplicata dos resultados em função do tempo necessário para redução de 6 logaritmos (10⁶), os quais estão representados na Tabela 3. O valor D é a exposição tempo necessário para reduzir a população microbiana por um fator de 10 (90%) (BOSCARIOL et al., 2008; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINTO et al., 2015; USP, 2016).

Tabela 3: Resultado do valor D das tiras de papel impregnadas com diferentes microrganismos na forma vegetativa, em relação ao tempo necessário para redução logarítmica da carga microbiana inicial (Valor Inicial), submetidas ao processo de esterilização por ozônio.

Microrganismo	Valor Inicial (N0)	Valor Final 10 UFC	log	Tempo de redução (Valor D)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	7×10^6	<10		< 3,42 minutos
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> (ATCC 9027)	38×10^6	<10		< 3,04 minutos
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	8×10^5	<10		< 4,08 minutos
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	20×10^6	<10		< 3,17 minutos
<i>Salmonella</i> (ATCC 13311)	3×10^6	<10		< 3,66 minutos
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	4×10^5	<10		< 4,34 minutos
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2×10^6	<10		< 3,77 minutos

Em estudo realizado por Kowalski et al. (1998), bactérias *E. coli* e *S. aureus* na forma vegetativas, foram inativadas em um período de 8 minutos, após serem expostas ao ozônio no ar ambiente em concentração de 1500 ppm e umidade relativa entre 18 – 20 %. Posteriormente, Currier e colaboradores (2001), demonstraram eficácia esterilizante do gás ozônio seco em concentrações entre 10.000 e 12.000 ppm, durante o tempo de uma hora de exposição, em diferentes bactérias na forma vegetativa. Estes estudos demonstram que o fator umidade acelera o processo de esterilização, uma vez que favorece a ação oxidativa do ozônio, reduzindo o tempo de ação esterilizante do ozônio.

Sendo assim, os resultados do valor D das tiras de papel impregnadas com diferentes microrganismos na forma vegetativa com tempos reduzidos para ação esterilizante do ozônio obtido neste estudo são compatíveis aos parâmetros elevada

concentração do ozônio e umidade relativa presentes neste processo de esterilização por ozônio, estudado. Vale ressaltar também que, a forma vegetativa dos microrganismos possui maior sensibilidade aos processos esterilizantes, convencionais, amplamente estudados (BOSCARIOL et al, 2008; MOAT, 2009; MAHFOUDH et al, 2010; PINTO et al, 2015).

5.1.2. Estudo com microrganismo na forma esporulada

Sabendo-se da sensibilidade microbiana ao processo de esterilização na forma vegetativa, preconiza-se a utilização da forma esporulada para comprovação da ação esterilizante e validação do processo. Sendo assim, estudos realizados anteriormente desafiaram esporos de *Geobacillus stearothermophilus* como indicador biológico com maior resistência (SHINTANI et al., 2003; SAKURAI et al., 2003; DUFRESNE et al., 2008).

Assim também, procedeu-se a desafios de esporos deste microrganismo ao processo de esterilização nas mesmas condições que os microrganismos da forma vegetativa foram submetidos. Estudou-se três réplicas para cada um dos tempos de exposição ao ozônio (Tabela 1), com o objetivo de encontrar uma situação quantal que permitisse o cálculo do valor D. Esta situação foi determinada após 60 minutos de ação do ozônio (Tabela 4).

Desta forma, o valor D para esporo de *Geobacillus stearothermophilus*, foi calculado com base nos resultados obtidos na Tabela 4, pela detecção de letalidade por fração negativa, o qual foi realizado pelo método Stumbo, Murphy e Cochran. Portanto, foi calculado o valor D de cada uma das posições através da média da triplicata dos resultados obtidos e, mais uma vez, calculada a média dos valores D.

1	E	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
2	E	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
3	E	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
1	F	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
2	F	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
3	F	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
1	G	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
2	G	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
3	G	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
1	H	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
2	H	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
3	H	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)

(+): Resultado positivo para indicadores biológicos (crescimento microbiano).

(-): Resultado negativo indicadores biológicos.

Obtida a média do valor $D = 9,01$ minutos, procedeu-se adicionalmente ao cálculo do desvio padrão relativo (DPR), tendo-se obtido o valor de 0,33 minutos, assim como o intervalo de confiança (IC 95 %) entre 8,77 e 9,24 minutos (Tabela 5). O valor D foi multiplicado por seis (para obter o tempo de exposição necessário para a redução de seis logarítmicos) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; Pinto, 2015; USP, 2016). Desta forma, considera-se a necessidade de tempo de 54,1 minutos, para se atingir redução de 6 ciclos log, o que corresponde a ciclo caracterizado por 3 pulsos. Entretanto, por segurança, foi considerado 4 pulsos como meio ciclo, uma vez que se observou ausência de crescimento microbiano nesta condição, e o ciclo completo caracterizado por 8 pulsos (ISO, 2009) (Figura 23). Ou seja, após o fechamento da porta, há a produção de vácuo, seguido por uma umidificação da câmara. O ozônio é então injetado, e começa o processo de esterilização, e repetido o processo quatro vezes, correspondendo ao meio ciclo. Quando o meio ciclo for alcançado, os passos, a partir do vácuo, para as fases de injeção de ozônio, são repetidos, o que corresponde o ciclo completo, seguido por uma fase final de ventilação para remover o ozônio.

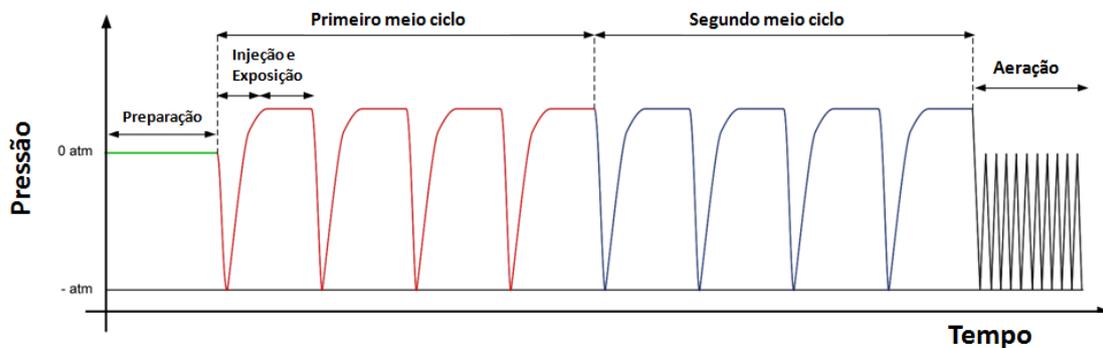


Figura 23: Esquema representando o meio ciclo e ciclo completo de esterilização por ozônio.

Tabela 5: Resultado do Valor D em minutos (min) para esporos de *Geobacillus stearothermophilus* calculado para cada uma das posições dos IB distribuídos no interior da câmara e a média destes valores.

Posição na câmara do esterilizador	Valor D (min)
Posição 1	9,22
Posição 2	9,39
Posição 3	9,54
Posição 4	8,77
Posição 5	9,02
Posição 6	9,02
Posição 7	9,02
Posição 8	8,38
Posição 9	8,77
Posição 10	9,02
Média	9,01
Desvio padrão	0,33
Intervalo de confiança (95 %)	8,77 a 9,24

Sendo assim, o desempenho do esterilizador por ozônio da empresa Ortossíntese, o qual foi avaliado empregando esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), atende a exigência de redução de seis logarítmicos, segundo o Nível de Garantia de Esterilidade de 10^{-6} (*Sterility Assurance Level - SAL*). A ausência de crescimento microbiano, após 54 minutos de exposição dos esporos microbianos ao gás ozônio, permite inferir resultado esterilizante satisfatório. Deve-se ressaltar que as condições utilizadas e os parâmetros adotados nas avaliações são imprescindíveis para demonstrar a eficácia e caracterizar o processo desenvolvido, empregando método e equipamento propostos para esterilização por ozônio, como tecnologia de esterilização eficaz.

5.2. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Após o cálculo do valor D para indicador biológico de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, tiras impregnadas com esporos foram observadas microscopicamente e os esporos fotografado, de modo a permitir informações sobre possíveis alterações morfológicas nos esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, após serem submetidos ao processo de esterilização. Os esporos íntegros, ou seja, os que não foram submetidos ao processo de esterilização, estão representados na Figura 24 (a) e os que passaram pelo processo de esterilização na Figura 24 (b).

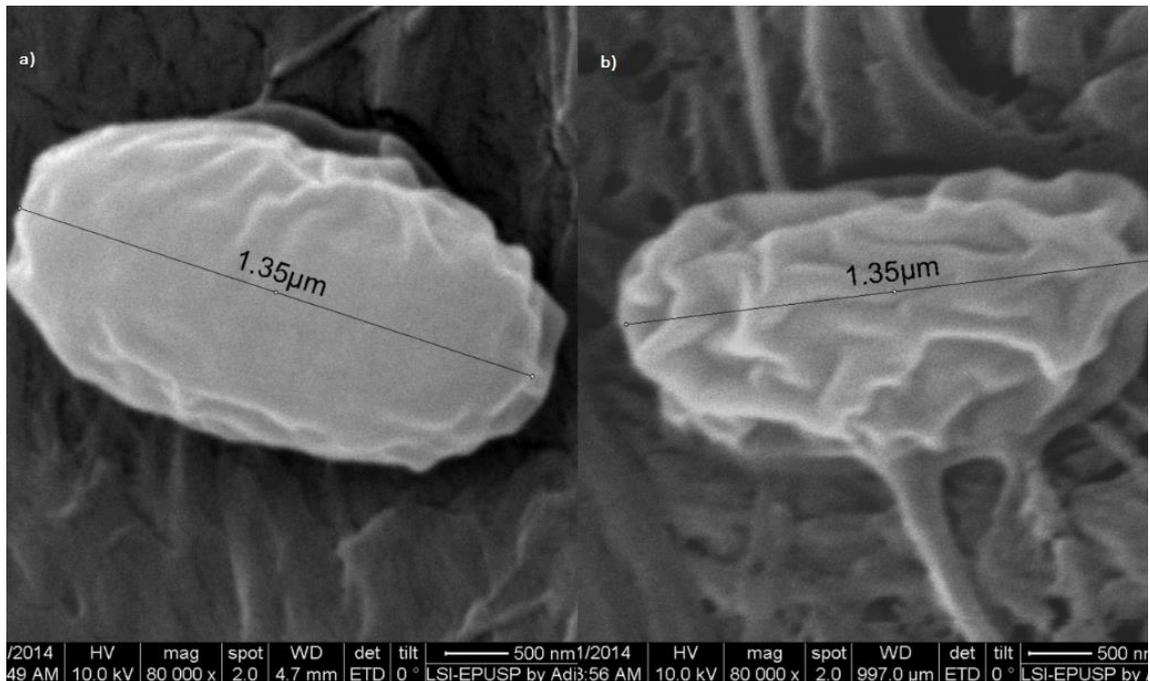


Figura 24: Eletromicrografia de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 por Microscopia Eletrônica de Varredura, antes (a) e depois (b) de passarem pelo processo de esterilização por ozônio.

Pode-se observar a mudança morfológica do esporo pela ação oxidativa do ozônio o que era esperado uma vez que substâncias fortemente oxidantes são geralmente capazes de agir sobre a constituintes químicos de microrganismos, ou seja, proteínas, lipídeos insaturados, lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas, enzimas intracelulares (por exemplo, enzimas respiratórias) e ácidos

nucleicos (material genético), bem como proteínas e peptidoglicanos presentes em paredes de esporos e cápsulas de vírus (TSENG; LI, 2008)

5.3. Desafios com produtos simulados

Foram realizadas etapas adicionais ao trabalho simulando possíveis produtos a serem esterilizados empregando a tecnologia em questão.

Tendo em vista a elevada prevalência na utilização de seringas, e simultaneamente este item constituir-se em desafio importante para o acesso a agentes esterilizantes, estes foram selecionados como um dos itens para elaboração de monitores. Também, constituem-se em situação semelhantemente, cânulas, cateter, formas tubulares empregadas como monitores. Assim, foram feitos desafios com seringas de 3 mL de polipropileno e canulados de aço inoxidável e de silicone com diferentes comprimentos e diâmetros. Tais itens, artificialmente inoculados, foram submetidos ao processo de meio-ciclo (4 pulsos) e ciclo completo (8 pulsos), com a finalidade de avaliar a difusibilidade do ozônio suficiente para garantir a eficácia da esterilização.

5.3.1. Seringas de polipropileno de 3 mL

As seringas inoculadas com tiras de papel impregnadas com a carga de 10^6 de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 submetidas ao processo de esterilização, após 14 dias de incubação, foram analisadas qualitativamente. Contudo, não foi observado crescimento microbiológico na avaliação do total das 18 seringas sem a agulha e mais 18 seringas com agulha e seus respectivos protetores, correspondendo à esterilização dos processos de meio-ciclo e ciclo letal por ozônio.

Embora não tenha sido encontrado relatos na literatura sobre estudo semelhante com o gás ozônio, este resultado leva a considerar a capacidade de penetração do ozônio em materiais constituídos de polipropileno, mesmo em situações de pior caso, como o simulado com as seringas e seus respectivos protetores, os quais dificultariam o acesso do gás ao interior das mesmas.

5.3.2. Estruturas canuladas de aço inoxidável e de silicone

Em estudo semelhante realizado por Dufresne e colaboradores (2008), foram submetidos a esterilização por ozônio, lumens rígidos de aço inoxidável com comprimento de 45 a 70 cm e diâmetro de 0,5 a 4 mm inoculados com *G. stearothermophilus* ATCC 7953, com biocarga de $2,0 \times 10^6$. Após 14 dias de incubação, apenas um lumem de 1 mm de diâmetro e 50 cm de comprimento apresentou crescimento microbiano. Entretanto, neste estudo não há relato dos parâmetros concentração do gás, umidade relativa e tempo de exposição que configuram o ciclo de esterilização do equipamento utilizado. Além disso, não foi avaliada a ação do gás ozônio em lumens flexíveis.

Sendo assim, foram criados desafios biológicos, compostos por cânulas de silicone e de aço inoxidável que variam entre 45 e 70 cm de comprimento, de acordo com o diâmetro (0,5 mm x 45 cm; 1 mm x 50 cm; 2 mm x 57,5 cm; 3 mm x 65 cm e 4 mm x 70 cm), com a finalidade de avaliar a difusibilidade do ozônio suficiente para garantir a eficácia da esterilização. Tais canulados, foram utilizados de forma a permitir avaliação da letalidade das tiras impregnadas com carga de 10^6 de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 introduzidas no interior dos mesmos.

Os resultados foram avaliados tanto qualitativamente quanto quantitativamente, os quais não foram observados crescimento microbiano nos IBs alojados no interior dos canulados em todos os desafios com aço inoxidável e silicone, nos cinco diferentes comprimentos e diâmetros, submetidos ao meio-ciclo, nas três réplicas. Assim como os IBs autocontidos que foram embalados externamente ao canulados, como forma de controle, apresentaram resultados negativos em todas as réplicas (Tabela 6 e 7).

Pode-se verificar redução significativa da carga microbiana ($> 10^6$ ou 6 ciclos log) presente nos indicadores biológicos, uma vez que não foi detectado crescimento nos testes realizados, o que demonstra a eficácia do processo de esterilização por ozônio. Sendo assim, com base nos resultados de meio ciclo, pode-se afirmar que o processo assegura nível de esterilização (SAL) de 10^{-12} , ou seja, redução da carga microbiana em 12 ciclos log, conforme preconizado pela literatura (ISO, 2009; USP, 2016).

Tabela 6: Resultados das três réplicas dos testes qualitativos dos canulados de silicone e aço inoxidável (Inox), submetidos ao meio ciclo do processo de esterilização por ozônio.

Teste Qualitativo						
Réplica	Comprimento	Diâmetro	Material			
			Silicone		Inox	
			IB Interno	IB Externo	IB Interno	IB externo
1	45 cm	0,5 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	50 cm	1 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	57,5 cm	2 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	65 cm	3 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	70 cm	4 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
2	45 cm	0,5 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	50 cm	1 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	57,5 cm	2 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	65 cm	3 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	70 cm	4 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
3	45 cm	0,5 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	50 cm	1 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	57,5 cm	2 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	65 cm	3 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)
	70 cm	4 mm	3(-)	3(-)	3(-)	3(-)

(-): Resultado negativo indicadores biológicos

Tabela 7: Resultados das três réplicas dos testes quantitativos, plaqueados em duplicata, dos canulados de silicone e aço inoxidável (Inox), submetidos ao meio ciclo do processo de esterilização por ozônio.

Teste Quantitativo						
Réplica	Comprimento	Diâmetro	Diluições	Material		CP
				Silicone	Inox	
1	45 cm	0,5 mm	1/10	N/D	N/D	1.1 x 10 ⁶
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
1	50 cm	1 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
1	57,5 cm	2 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
1	65 cm	3 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
1	70 cm	4 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
2	45 cm	0,5 mm	1/10	N/D	N/D	1.1 x 10 ⁶
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
2	50 cm	1 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
2	57,5 cm	2 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
2	65 cm	3 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
2	70 cm	4 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
3	45 cm	0,5 mm	1/10	N/D	N/D	1.1 x 10 ⁶
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
3	50 cm	1 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
3	57,5 cm	2 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
3	65 cm	3 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	
3	70 cm	4 mm	1/10	N/D	N/D	
			1/100	N/D	N/D	
			1/1000	N/D	N/D	

N/D: Nada Detectado

5.4. Estudo de citotoxicidade *in vitro* pelo método biológico de difusão em ágar

A cultura de células enquanto teste para avaliação da citotoxicidade de materiais tem se mostrado vantajosa, reunindo características como boa sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e diminuição do uso de animais de laboratório. Dados da avaliação da citotoxicidade de cateteres urinários de látex foram comparados frente a quatro ensaios biológicos: citotoxicidade em cultura celular, injeção intracutânea dos extratos em coelhos, implante intramuscular dos fragmentos dos cateteres em coelhos e catetização de ovelhas-teste de irritação de mucosa. Avaliando principalmente a sensibilidade e aplicabilidade prática, o teste de citotoxicidade em cultura celular com captura de vermelho neutro se mostrou adequado, cumprindo com as características comparadas (GRAHAM et al., 1984)

Nenhuma das amostras submetidas ao processo esterilizante por ozônio apresentaram halo claro limitado sob e/ou ao redor dos fragmentos de 0,5 x 0,5 cm, indicando ausência de citotoxicidade *in vitro* para a linhagem celular NCTC clone 929, tendo sido graduado com N=0.

Esses resultados são compatíveis com estudo realizado por Galante e colaboradores (2016), no qual se avaliou o possível desenvolvimento de efeito tóxico em nanopartículas de hidrogéis de quitosana, após serem submetidas ao mesmo equipamento protótipo de esterilização por ozônio, e sob os mesmos parâmetros de concentração do gás, umidade relativa, temperatura e tempo de exposição ao ozônio. Para tal, foi realizado teste de citotoxicidade *in vitro* com cultura de células de fibroblastos de linhagem NCTC 929. Os resultados não demonstraram reações biológicas adversas mesmo após exposições a tempos maiores que 8 pulsos de esterilização por ozônio. Em outro estudo semelhante com lentes de contato de hidrogéis à base de silicone, também não foi observado efeito citotóxico em amostras submetidas a 8 pulsos esterilizantes, entretanto, a tempos maiores de exposição ao gás, foi observado reatividade leve (GALANTE et al., 2017), o resultado não é considerado citotóxico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP, 2015).

5.5. Estudo por espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR).

A superfície de materiais médico-hospitalares confeccionados por polímeros, foi avaliada através de espectrofotômetro ATR-FTIR. Os espectros, de cada um dos materiais de PE, PVC e Silicone, obtidos após serem submetidos aos ciclos de esterilização por ozônio (1 ciclo, 2 ciclos e 3 ciclos) foram comparados com seus respectivos espectros que não sofreram ação do agente esterilizante (0 ciclo).

Os espectros do material a base de polietileno (PE) apresentam vibrações característica como estiramento C-H próximo a 2950 cm^{-1} modo tesoura ou dobramento angular próximo a 1460 cm^{-1} e modo de vibração de rotação em 720 cm^{-1} de CH_2 (KILIC, et. al., 2017). Entretanto, demonstraram a formação de uma banda em $\sim 1715\text{ cm}^{-1}$ (Figura 25) correspondente ao grupo carbonila (C=O), após passarem pelo processo de esterilização, o que caracteriza uma reação de oxidação entre o ozônio e a superfície do material (PETERSON, et. al., 2001; FERREIRA et. al., 2008; NGUYE, et. al., 2015). Embora os espectros de PE tenham demonstrado oxidação, os ensaios de citotoxicidade em cultura de células não revelam toxicidade.

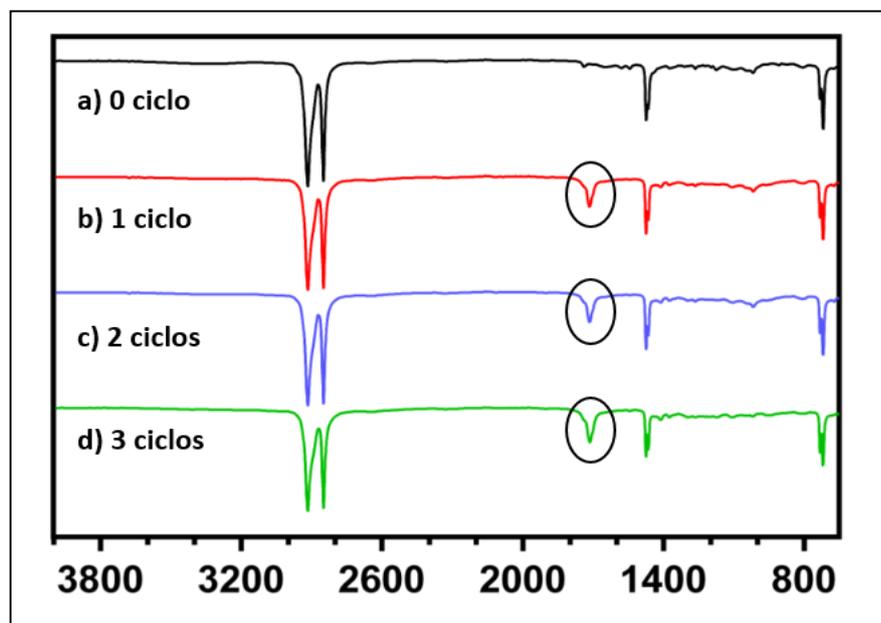


Figura 25: Espectros de ATR-FTIR de polietileno (PE) antes e depois da ação do ozônio como agente esterilizante.

Legenda: a) PE sem passar pelo processo de esterilização; b) PE após 1 ciclo de esterilização; c) PE após 2 ciclos de esterilização; d) PE após 3 ciclos de esterilização.

O material formado por PVC não demonstrou alteração significativa apresentando espectros com absorção características com bandas entre 2962-2853 cm^{-1} (estiramento, $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}$), 1330-1250 cm^{-1} (deformação δ , $-\text{CH}$ em $-\text{CHCl}-$), 1000-1200 cm^{-1} (absorção de propostas no plano de anéis aromáticos, $-\text{C}-\text{C}-$) e entre 690-615 cm^{-1} (estiramento, $\text{C}-\text{Cl}$) (KUMAGAI, et. al., 2007; BAOYING, et. al., 2009; DEL CARPIO, 2009) antes e depois de passar pelo processo de esterilização (Figura 26).

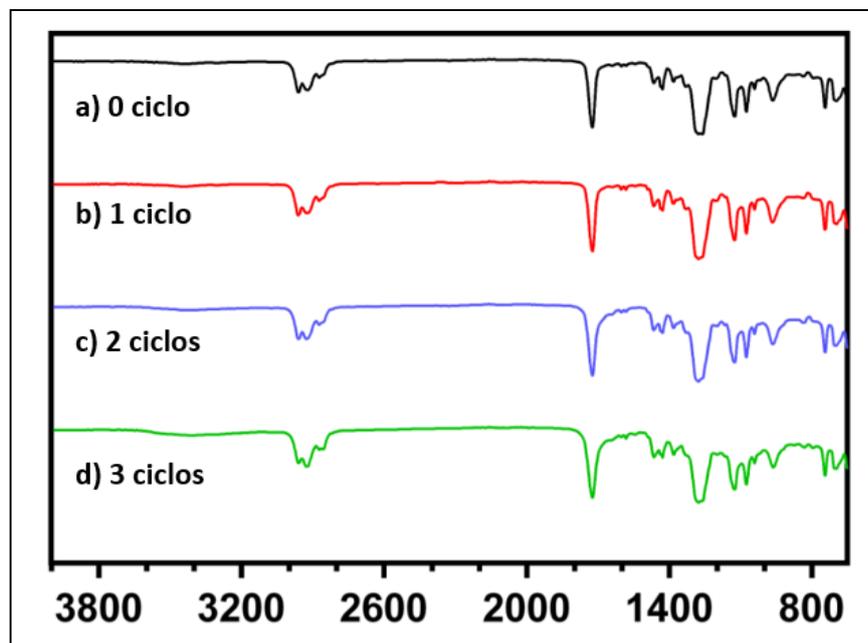


Figura 26: Espectros de ATR-FTIR de policloreto de vinila (PVC) antes e depois da ação do ozônio como agente esterilizante.

Legenda: a) PVC sem passar pelo processo de esterilização; b) PVC após 1 ciclo de esterilização; c) PVC após 2 ciclos de esterilização; d) PVC após 3 ciclos de esterilização.

Nos materiais de silicone, por apresentarem alta estabilidade em seu esqueleto polimérico, também não foi observado mudança significativa (Figura 26). Os espectros apresentam bandas de $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ (1055-1090 cm^{-1}), $\text{R}-\text{OH}$ (3050-3040 cm^{-1}), $\text{Si}-\text{OH}$ (875-920 cm^{-1}) e sinais correspondentes ao grupo metil, CH_3 (785-815, 1245-1270 cm^{-1}) presente no esqueleto do polímero (OZÇAM, et. al., 2014).

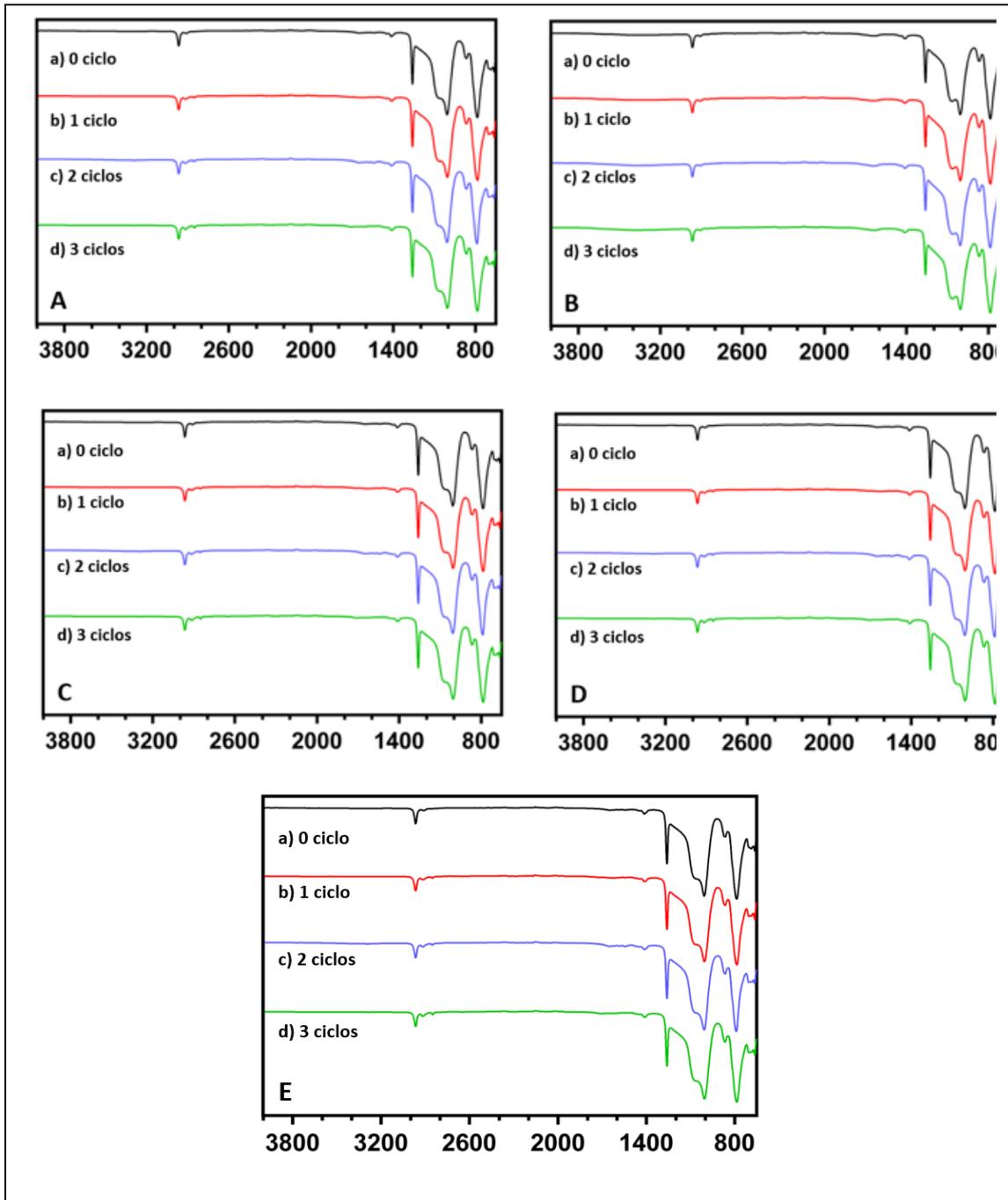


Figura 27: Espectros de ATR-FTIR de materiais médico-hospitalares de Silicone (Si) antes e depois da ação do ozônio como agente esterilizante.

Legenda: A – Balão Reservatório; B - Conector de silicone; C – Máscara Recém-Nato; D – Máscara Infantil; E – Traqueia. a) Si sem passar pelo processo de esterilização; b) Si após 1 ciclo de esterilização; c) Si após 2 ciclos de esterilização; d) Si após 3 ciclos de esterilização.

5.6. Estudo da eficácia do processo de despirogenização (endotoxina)

A Farmacopéia Americana preconiza a redução de 3 logaritmos da concentração original de endotoxina bacteriana para determinar que o produto é apirogênico. Os resultados da redução do logaritmo, dos frascos submetidos ao processo de esterilização por ozônio demonstraram redução da concentração inicial de endotoxina (Tabela 8), entretanto, nem todos os pontos atingiram a redução ideal neste ciclo. Desta forma, se faz necessário à validação do processo para a despirogenização da endotoxina bacteriana, embora o processo demonstre ser satisfatório para este fim.

Tabela 8: Resultados do teste de endotoxina bacteriana, em triplicata, submetidos ao ciclo completo do esterilizador por ozônio

Log da redução de endotoxina bacteriana			
Posição	Réplica		
	1	2	3
A	-2,11	-1,079	-2,23
B	-3,21	-2,19	-2,27
C	-1,96	-2,65	-1,75
D	-3,01	-3,11	-2,65
E	-2,72	-3,78	-2,80
F	-2,13	-2,06	-1,86

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O processo de esterilização por ozônio empregando protótipo de equipamento e sistema, foi desenvolvido aplicando 4 pulsos como meio ciclo e o ciclo completo caracterizado por 8 pulsos.

A determinação do valor D para o processo de esterilização por ozônio, considerando esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, empregando método quantal, obteve-se a média do valor D do processo igual a 9,01, sob os parâmetros adotados e para a configuração de câmara considerada.

A investigação da eficácia do processo de esterilização por ozônio com desafios caracterizados por seringas de 3 mL e canulados de aço inoxidável e elastômero silicone com dimensões variando entre 45 e 70 cm de comprimento, de acordo com o diâmetro (0,5 mm x 45 cm; 1 mm x 50 cm; 2 mm x 57,5 cm; 3 mm x 65 cm e 4 mm x 70 cm), demonstraram resultados satisfatórios.

Corroborando com a biocompatibilidade dos materiais submetidos ao processo de esterilização, segundo os espectros de ATR-FTIR, apesar de detectada modificação química no material constituído de polietileno, esta não levou ao aparecimento de toxicidade quando do teste de citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar. Nos outros polímeros estudados (silicone e PVC), não foram observados nos espectros quaisquer modificações químicas, assim como, qualquer nível de reatividade biológica após testes de citotoxicidade.

A investigação quanto ao potencial de despirogenização do processo de esterilização por ozônio, apesar de não ter promovido suficiente redução decimal de endotoxinas para caracterizar a sua eficácia, evidenciou resultados promissores de redução de níveis de endotoxina.

Tais considerações permitem concluir pela segurança do paciente quando da utilização de materiais esterilizados por ozônio, em processo devidamente validado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLIN, M.I.; GATAULLIN, R.F.; MINSKER, K.S.; KEFELI, A.A.; RAZUMOVSKII, S.D.; ZAIKOV, G.E. Effect of Ozone on Poly(Vinyl Chloride) Degradation. *European Polymer Journal*. 14, 811-816, 1978.
2. ALISKA, M.A., Medidas De Espectroscopia No Infravermelho Médio Para A Determinação Do Teor De Biodiesel Em Óleo Diesel. Dissertação de Mestrado. Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Paraná. 2010.
3. AZEVEDO, J.C. *Segurança biológica de implantes mamários de silicone: interrelação entre processos esterilizantes e biocompatibilidade*. São Paulo, 2004. 91p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
4. BAOYING, L.V.; ZHAO, G.; LI, D.; LIANG, C. Dechlorination and Oxidation for Waste Poly(Vinylidene Chloride) by Hydrothermal Catalytic Oxidation on Pd/AC Catalyst. *Polymer Degradation and Stability*. 94(7), 1047-1052, 2009.
5. BARBES, L.; RĂDULESCU, C.; STIHI, C. ATR-FTIR Spectrometry characterisation of polymeric materials. *Romanian Report in Physics*, vol. 66 (3), p. 765-777, 2014
6. BARCELOS, I. D. *Estudo de propriedades estruturais e óticas de heteroestruturas formadas por materiais bidimensionais*. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2015.
7. BARTH, T.; DALMORA, V.J.; D'AVILA, F.B.; DALMORA, S.L. Avaliação de pirogênios em produtos de uso veterinário pelos testes da hipertemia em coelhos e do lisado de amebócitos do *Limulus*. *Ciência Rural*. v. 37, n. 1, p. 190-194, 2007

8. BELL ML, SAMOT JM, ZEGER SI, DOMINICI F, MCDERMOTT A. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *The Journal of the American Medical Association*, 292: 2372-8. 2004.
9. BOCCI, V., VALACCHI G., CORRADESCHI F., FANETTI G., Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production, *Mediat.Inflamm.* 7:313-317, 1993.
10. BOCCI V. Ozone: a New Medical Drug. Dordrecht: *Ed. Springer*, 2005
11. BOSCARIOL, M. R.; MOREIRA, A.J.; MANSANO, R.D.; KIKUCHI, I.S.; PINTO, T.J.A. Sterilization by pure oxygen plasma and by oxygen-hydrogen peroxide plasma: An efficacy study. *International Journal of Pharmaceutics*. 353, 170-175, 2008.
12. BROADWATER, W.T., HOEN, R.C., KING, P.H. Sensitivity of Three Selected Bacterial Species to Ozone. *Appl. Microbiol*, 26: 391–393, 1973
13. BURANOV, S.N; KARELIN, V.I.; SELEMIR, V.D.; Sterilizing effect of ozone on live spores of anthrax bacillus. *Russian Federal Nuclear Center* 2005.
14. CHERNICHARO A. L, et al. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por sistemas de desinfecção. Pós-tratamento de efluentes anaeróbios. PROSAB, Rio de Janeiro, cap.7. Desinfecção ultra violeta. 1999.
15. CHO M, CHUNG H, YOON J. Desinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radicals reactions. *Applied and Environmental Microbiology*; 69(4):2284-91. 2003.
16. CORONEL, B., DUROSELLE, P., BEHR, P., MOSKOVTCHEKOV, J.F. FRENEY, J. In situ Decontamination of Medical Wastes Using Oxidative Agents: A 16 Month Study in a Polyvalent Intensive Care Unit. *J. Hosp. Infect*, 50: 207–212,.2002.

17. CROMPTON, T.R. Thermo-Oxidative Degradation of Polymers. Smithers Rapra, United Kingdom, 136 p., 2010.
18. CRUZ, A.S. *Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos*. São Paulo, 2003. 107p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
19. CURRIER, R.P., TORRACO, D.J., CROSS, J.B., WAGNER, G.L., GLADDEN, P.D. and Vanderberg, L.A. Deactivation of Clumped and Dirty Spores of *Bacillus globigii*. *Ozone Sci. Eng*, 23: 285–294. 2001.
20. DEL CARPIO, D.C.F. *Degradação Físico-Química do PVC Causada por Derivados de Petróleo*. Dissertação. Engenharia dos Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
21. DUFRESNE, S., LEBLOND, H.; CHAUNET, M. Relationship between lumen diameter and length sterilized in the 125L ozone sterilizer. *Am J Infect Control* 2008 May;36(4):291-7.
22. ELFORD, W.J.; VAN DEN ENDE, J. An Investigation of the Merits of Ozone as an Aerial Disinfectant. *J. Hygiene*, 42: 240–265. 1942.
23. FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 321-326, 2010.
24. FAHRENFORT, J., Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. *Spectrochim Acta*. 17 (7), p. 698-709, 1961.
25. FERREIRA, F.G.D.; LIMA, M.A.G.A.; ALMEIDA, Y.M.B.; VINHAS, G.M. Effect of the radiolytic sterilization in polyethylene/ starch blends. *Quim. Nova*. Vol. 31(5), 2008.

26. FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique* 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397p.
27. GALANTE, R.; REDIGUIERI, C.F.; KIKUCHI, I.S.; VASQUEZ, P.A.; COLAÇO, R.; SERRO, A.P.; PINTO, T.J. About the Sterilization of Chitosan Hydrogel Nanoparticles. *PLoS One*. 11(12), 2016.
28. GALANTE, R.; GHISLENI, D.; PARADISO, P.; ALVES, V.D.; PINTO, T.J.A.; COLAÇO, R.; SERRO, A.P. Sterilization of silicone-based hydrogels for biomedical application using ozone gas: Comparison with conventional techniques. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 78:389-397, 2017.
29. GONÇALVES, R. C. S. Risco para Contaminação de Artigos: Uma Proposta de Diagnóstico de Enfermagem. Dissertação (Mestrado Profissional) em Enfermagem Assistencial - Escola de Enfermagem Aurora de Afonso Costa, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.
30. GOTO, Y.; KITANO, K.; MAROUKA, T.; YAMAMOTO, M.; KONO, A.; HORIBE, H.; TAGAWA, S. Removal of Polymers with Various Chemical Structures Using Wet Ozone. *Journal of Photopolymers Science and Technology*. 23(3), 417-420, 2010.
31. GRAHAM, D.T.; MARK, G.E.; POMEROY, A.R.; MACARTHUR, E.B. *In vivo* validation of a cell culture test for biocompatibility testing of urinary catheters. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.18, p.1125-135, 1984.
32. GRAZIANO, K.U. Processos de limpeza, desinfecção e esterilização de artigos odonto-médico-hospitalares e cuidados com o ambiente de centro cirúrgico. In: LACERDA RA, coordenadora. *Controle de infecção em centro cirúrgico: fatos, mitos e controvérsias*. São Paulo: Atheneu; 2003.
33. GUGUMUS, F. Re-examination of the thermal oxidation reactions of polymers 2. Thermal oxidation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*. Vol 76 (2), p. 329-340, 2002.

34. HENDERSON, B. et al. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue by inducing cytokine synthesis. *Microbiological Research*, v. 60, n. 2, p. 316-341, 1996
35. HUNT, N.; MARINAS, B.J. Inactivation of *Escherichia coli* with Ozone: Chemical and Inactivation Kinetics. *Water Res*, 33: 2633–26, 1999
36. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10.993-5: biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: in vitro methods*. Geneva: ISO, 1999. 7p.
37. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION *ISO 14937:2009 – Sterilization of health care products – General requirement for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices*.
38. ISHIZAKI, K., SHINRIKI, N. MATSUYAMA, H. 1986. Inactivation of *Bacillus* Spores by Gaseous Ozone. *J. Appl. Bacteriol*, 60: 67–72. 1986.
39. JORGE RA, RODRIGUEZ YL, RODRIGUEZ AC, RUIZ A. Producción científica sobre aplicaciones terapêuticas del ozono en el web science. *ACIMED* [online]; 14(1).2006.
40. KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho/espectroscopia fotoacústica no infravermelho. In: CANEVAROLO Jr., S.V., coord. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004. 448p.
41. KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E. Sporicidal Action of Ozone and Hydrogen Peroxide: A Comparative Study. *Int. J. Food Microbiol*, 71: 131–138.2001
42. KILIC, M.; KARABUL, Y.; ALKAN, U.; YAGCI, O.; OKUTAN, M.; OKUTAN, M.; ICELLI, O. Gamma-Ray Irradiation Effect on Mechanical and Dielectric

- Properties of Volcanic Basalt Mineral Reinforced Low Density Polyethylene Films. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*. 53 (1), 578-590, 2017.
43. KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation Kinetics of Foodborne Spoilage and Pathogenic Bacteria by Ozone. *Journal of Food Science*. v.65, n.3, p.521-528, 2000
44. KITAZAKI, S.; TANAKA, A.; HAYASHI, N. Sterilization of narrow tube inner surface using discharge plasma, ozone, and UV light irradiation. *Vacuum*. Vol. 110, p. 217-220, 2014.
45. KOWALSKI, W.J., BANHFLETH, W.P.; WHITTAM, T.S. Bactericidal Effects of High Airborne Ozone Concentrations on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ozone Sci. Eng*, 20: 205–221, 1998.
46. KOMANAPALLI, I.R.; LAU, B.H.S. Ozone-Induced Damage of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 46: 610–614, 1996
47. KOMANAPALLI, I.R.; LAU, B.H.S. Inactivation of bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v.49, n.6, p.610–614, 1998
48. KUMAGAI, H.; KUSUNOKI, T.; KOBAYASHI, T. Surface Modification of Polymers by Thermal Ozone Treatments. *The Azo Journal of Material Online*. Vol 3, 2007. <DOI : 10.2240/azojomo0246>
49. LUZ, E.R. Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR e regressão por mínimos quadrados. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.
50. MAHFOUDH, A.; BARBEAU, J.; MOISAN, M.; LEDUC, A.; SÉGUIN, J. Biocidal action of ozone-treated polystyrene surfaces on vegetative and sporulated bacteria *Applied Surface Science*. p. 3063–3072, 2010.

51. MARSIT, N. M.; SIDNEY, L. E.; BRANCH, M. J.; WILSON, S. L.; HOPKINSON, A. Terminal Sterilization: Conventional Methods versus Emerging Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology for Non-Viable Biological Tissues. *Plasma Process and Polymers*. v.14, n.7, 2017.
52. MASSUDA, S.; IEEE, F.; KISS, E.; ISHIDA, K.; ASAI, H. Ceramic-Based Ozonizer for High-Speed Sterilization. *IEEE Transactions on Industry Applications*. 26(1):36-41, 1990.
53. MERRET, K.; CORNELIUS, R.M.; MCCLUNG, W.G; UNSWORTH, L.D.; SHEARDOWN, H. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.13, n.6, p.593-621, 2002.
54. MIOSAN M.; BARBEAU J.; MORCAU S.; PELLETIER J.; TABRIZIAN M.; YAHIA L.H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, May 2001, 226, p. 1-21.
55. MOAT, J.; CARGILL, J.; SHONE, J.; MATHEW, U.: Application of a novel decontamination process using gaseous ozone. *J. Microbiology*. 55, p.928-933, 2009.
56. MURAL, P.K.S.; JAIN, S.; MADRAS, G.; BOSE, S. Antibacterial Membranes for Water Remediation with Controlled Leaching of Biocidal Silver Aided by Prior Grafting of Poly(ethylene imine) on to Ozone-Treated Polyethylene. *ChemistrySelect*. Vol. 2, p. 624-631, 2017.
57. MURPHY L. Ozone-the latest advance in sterilization of medical devices. *Can Oper Room Nurs J*. 2006;24(2):28-38
58. NGUYEN, T-A., GREGERSEN, O.W., MÄNNLE, F. Thermal Oxidation of Polyolefins by Mild Pro-Oxidant Additives Based on Iron Carboxylates and

- Lipophilic Amines: Degradability in the Absence of Light and Effect on the Adhesion to Paperboard. *Polymer*, 7 (8), 1522-1540, 2015.
59. NOGAROTO, S.L.; PENHA, T.C.V. *Desinfecção e Esterilização*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2006.
60. OH, B.T.; SEO, Y.S.; SUDHAKAR, D.; CHOE, J.H.; LEE, S.M.; PARK, Y.J. CHO, M. Oxidative Degradation of Endotoxin by Advanced oxidation Process (O₃/H₂O₂ & UV/H₂O₂). *J. Hazard Mater.* 279, 105-110, 2014.
61. OLIVEIRA, D.C. *Sistema de Esterilização por Plasma: Estudo de Compatibilidade em Polímeros e Eficácia Esterilizante em Produtos Médico-Hospitalares de Calibres Reduzidos e Longa Extensão*. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
62. OLIVEIRA, R.; MARUYAMA, S.A.T. Controle de Infecção Hospitalar: Histórico e Papel do Estado. *Ver. Eletr. Enfermagem*. 10(3), 775-83, 2008.
63. ORREGO, J. A.; HERNANDEZ, R.C.; MEJÍA-OSPINO, E. Structural study of colombian coal by fourier transform infrared spectroscopy coupled to attenuated total reflectance (FTIR-ATR). *Revista Mexicana de Física*. 56 (3) 251–254, 2010
64. OZÇAM, A. E.; EFIMENKO, K.; GENZER, J. Effect of Ultraviolet/Ozone on the Surface and Bulk Properties of Poly(dimethyl siloxane) and Poly(vinylmethyl siloxane) networks. *Polymer*. 55, p. 3107-3119, 2014.
65. PAOLI, M.A. *Degradação e Esterilização de Polímeros*. 2ª versão on-line, 2008.
66. PETERSON, J.D.; VYAZOVKIN, S.; WIGHT, C.A. Kinetics of the Thermal and Thermo-Oxidative Degradation of Polystyrene, Polyethylene and Poly(propylene). *Macromol. Chem. Phys.* 202, p. 775-784, 2001.

67. PINTO, T.J.A. *Aspectos fundamentais na validação do monitor biológico para a esterilização por óxido de etileno*. São Paulo, 1991. 203p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
68. PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., PINTO, A.F. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
69. RAAB, S.; KLINGENSTEIN, M.; LIEBAU, S.; LINTA, L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int*, 2014 <doi: 10.1155/2014/768391>.
70. REAL, L.E.P.; FERREIRA, A.M.; REGO, A.M.B. Comparison of Different Photo-Oxidation Conditions of Poly(Vinyl Chloride) for Outdoor Applications. *Polymer Testing*. 27, 743-751, 2008.
71. REBELLO, F. L.; BOTELHO, T. S.; PINTO, T. J. A. How pH, Temperature, and Time of Incubation Affect False-Positive Responses and Uncertainty of the LAL Gel-Clot Test. *PDA J. Pharm. Sci. and Tech.* 66, 542-546, 2012.
72. RIDIQUIERI, C.F.; PINTO, T.J.A.; BOU-CHACRA, N.A.; GALANTE, R.; ARAÚJO, G.L.; PEDROSA, T.N.; MARIA-ENGLER, S.S.; BANK, P.A. Ozone Gas as a Benign Sterilization Treatment for PLGA Nanofiber Scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 22(4), 338-47, 2016.
73. RIETSCHEL, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular, relationships of structure to activity and function. *Journal Parenteral of Science and Technology*, v. 8, p. 217-225, 1994.
74. RICKLOFF, J. R. An Evaluation of the Sporicidal Activity of Ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 683-686, 1987.

75. RODOLFO JR. A.; MEI, L.H.I. Mecanismo de Degradação e Estabilização Térmica do PVC. *Plímeros*, 17(3), 2007.
76. ROGERO, S.O.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*. 6(3):317-320, 2003.
77. ROGERS, W. *Sterilisation of Polymer Healthcare Products*. Shrewsbury: Rapra Technology Limited, 2005.
78. RUGG, F.M.; SMITH, J.J.; BACON, R.C. Infrared séctrophotometric studies on polyethylene. II. Oxidation. *Polymer Chemistry*. Vol 13 (72), p. 535-547, 1954.
79. RUTALA, W.A; WEBER, D.J. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Atlanta (EUA): *Center for Disease Control and Prevention*, 2008.
80. SALMON M, KOTO H, LYNCH OT, HADDAD E, LAMB N, QUINLAN GJ, Proliferation of airway epithelium after ozone exposure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 157:970-7. 1998
81. SAKURAI, M.; TAKAHASHI, R.; FUKUNAGA, S.; SHIOMI, S., KAZUMA, K.; SHINTANI, H. Several Factors Affecting Ozone Gas Sterilization. *Biocontrol Science* 2003;18(2):69-76
82. SHARMA, M.; HUDSON, J.B. Ozone Gas is an Effective and Practical Antibacterial Agent. *Am J Infect Control*. 36(8), 559-63, 2008.
83. SHINTANI, H.; SUKURI, E.; SAKURAI, M.: Determination of compounds inhibiting bacterial growth in sterilized medical devices. *Chromatographia*, Aug 2003, 58, p. 193-9.
84. SILVA, F.E.B., DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ATR-FTIR E

- DRIFTS EMPREGANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química., 2008.
85. SILVA, S.B.; LUVIELMO, M.M.; GEYER, M.C.; PRA, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Ciências Agrárias*, v.32, n.2, p. 659-682, 2011
86. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
87. SOUSA, C.S; TORRES, L.M.; AZEVEDO, M.P.F.; CAMARGO, T.C.; GRAZIANO, K.U.; LACERDA, R.A.; TURRINI, R.N.T. Gás ozônio na esterilização de produtos para assistência à saúde: revisão integrativa da literatura. *Rev. Esc. Enferm. USP* 211; 45(5):1243-9.
88. SUNNEN GV. Ozone in medicine: overview and future directions. *Journal of Advancement in Medicine*; 1(3):159-74.1988
89. TESSAROLO, F.; CAOLA, I.; NOLLO, G.; ANTOLINI, R.; GUARRERA, G.M.; CACIAGLI, P. Efficiency in Endotoxin Removal by a Reprocessing Protocol for Electrophysiology Catheters based on Hydrogen Peroxide Plasma Sterilization. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209(6), 557-565, 2006.
90. THANOMSUB, B., ANUPUNPISIT, V., CHANPHETCH, S., WATCHARACHAIPO NG, T. POONKHUM, R., SRISUKONTH, C. Effects of Ozone Treatment on Cell Growth and Ultrastructural Changes in Bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 48: 193–199, 2002.

91. TSENG, C. LI, C. Inactivation of Surfaces Viruses by Gaseous Ozone. *J. Environ. Health*, 70: 56–62. 2008.
92. UNITED States Pharmacopeia. 38 ed. *Biological Reactivity Tests, In Vitro*. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention. v. 1, 2015.
93. UNITED States Pharmacopeia. 39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention. v. 1, 2016.
94. URBANIAK-DOMAGALA, W. The Use of the Spectrometric Technique FTIR-ATR to Examine the Polymers Surface. Chapter 3. In: MUHAMMAD, A. F. *Advanced Aspects of Spectroscopy*. Publisher: InTech, p. 85-104, 2012 <<http://dx.doi.org/10.5772/48143>>
95. YAMAYOSHI, T.; TATSUMI, N. Microbiocidal Effects of Ozone Solution on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res*. 19(2), 59-64, 1993.