Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Leonardo Teixeira Rodrigues

Estratégia para validação de processos de esterilização por vapor saturado em autoclaves nas indústrias farmacêuticas

Rio de Janeiro
2010

Leonardo Teixeira Rodrigues

Estratégia para validação de processos de esterilização por vapor saturado em autoclaves nas indústrias farmacêuticas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do titulo de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Processos Químicos e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof[a]. Dr[a]. Cristiane Assumpção Henriques

Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro
2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

R696 Rodrigues, Leonardo Teixeira.
Estratégia para validação de processo de esterilização por vapor saturado na indústria farmacêutica. / Leonardo Teixeira Rodrigues. - 2010.
123 f

Orientador: Cristiane Assumpção Henriques.
Orientador: Aderval Severino Luna.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Esterilização por vapor - Teses. 2. Autoclaves – Teses. 3. Vapor - Teses. 4. Indústria farmacêutica – Teses. I. Henriques, Cristiane Assumpção. II. Luna, Aderval Severino. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU621.772

Autorizo, apenas para fins acadêmicos ou científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura Data

Leonardo Teixeira Rodrigues

Estratégia para validação de processos de esterilização por vapor saturado em autoclaves nas indústrias farmacêuticas

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do titulo de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Processos Químicos e Meio Ambiente.

Aprovado em 25 de agosto de 2010

Banca Examinadora:

_____
Prof[a]. Dr[a]. Cristiane Assumpção Henriques (Orientadora)
Instituto de Química da UERJ

_____
Prof. Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

_____
D.Sc. Rodrigo Coelho Ventura Pinto
Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz

_____
Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química da UERJ

_____
Prof[a]. Dr[a]. Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Instituto de Química da UERJ

Rio de Janeiro
2010

AGRADECIMENTOS

- A Deus por ter me dado saúde e boas oportunidades.
- A minha esposa por ter estado ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida e por toda ajuda nos estudos e na vida profissional. Que venham agora os filhos.
- O meu avô Heitor que me mostrou o caminho em ser um grande homem com pequenos gestos e grandes atitudes.
- A minha irmã Letícia pela alegria contagiante.
- Ao meu pai Paulo que me apoiou em todas as minhas decisões.
- Aos meus orientadores Prof^{a}. Dr^{a}. Cristiane Assumpção Henriques e Prof. Dr. Aderval Luna pela ajuda e ensinamentos sobre análise estatística. Todas as críticas e sugestões foram muito importantes para a conclusão desta dissertação.
- Ao meu amigo Walter Alexandre por toda contribuição e apoio nas atividades profissionais e no desenvolvimento deste trabalho. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido.
- Ao meu chefe e amigo Fabio Henrique Gonçalez pela paciência e o prazer de trabalhar ao lado de um profissional tão qualificado. Um biólogo com uma visão de engenharia melhor que muitos engenheiros.
- À minha querida chefe Rita de Cássia Benedetti por todo incentivo e ajuda para cursar o mestrado junto com as minhas atividades profissionais.
- A toda equipe de Qualificação de Equipamentos pela oportunidade de liderar profissionais altamente qualificados e responsáveis. Com certeza a ajuda de vocês foi muito importante para finalização desta dissertação.
- Aos meus amigos especiais Carlos, Rodrigo e Daniel pela amizade e dedicação todos estes anos.
- Aos membros da banca por aceitarem o convite.

RESUMO

RODRIGUES, Leonardo Teixeira. *Estratégia para validação de processo de esterilização por vapor saturado na indústria farmacêutica.* 2010. 123f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O objetivo deste trabalho foi criar uma metodologia de validação e revalidação dos processos de esterilização por calor úmido em autoclaves horizontais, destacando os pontos críticos do processo e concentrando esforços onde são realmente necessários.

Foram realizados estudos de distribuição térmica, de penetração de calor e de desafio microbiológico na validação da autoclave STERIS FINNAQUA 6912. Com o objetivo de avaliar o impacto de uma mudança e compreender a relação entre os fatores e suas interações para o processo de esterilização, foi utilizado o planejamento fatorial 2^3 dos fatores densidade da carga (quantidade de itens), embalagem do produto e localização na câmara interna.

Os estudos de distribuição térmica confirmaram a distribuição homogênea de calor na câmara interna durante o tempo de exposição a 121°C. As temperaturas variaram entre 120,35°C e 120,92°C com desvio padrão máximo de 0,12°C.

Os estudos de penetração de calor confirmaram exposições equivalentes a 121°C por 24 minutos em todos os itens da carga (F_0 > 24 minutos). Em todos os estudos para cargas secas, os índices de capacidade do processo (Cpk) foram maiores que 1,33.

Os ensaios de desafio microbiológico garantiram níveis de esterilidade (S.A.L.) maiores que 12 reduções logarítmicas em relação aos indicadores biológicos *Geobacillus stearothermophilus.* Não foi detectada a presença de endosporos sobreviventes nos 132 indicadores biológicos utilizados nos quatro ciclos desafiados.

Com base no planejamento experimental verificou-se que, para o nível de significância de 95% , as mudanças nos fatores posição, embalagem e quantidade da carga não são significativas para o processo de esterilização, em autoclave com remoção forçada de ar. Já para o nível de significância de 90%, a interação Posição x Embalagem apresentou significância estatística no processo de esterilização com valor P de 0,080.

Palavras-chave: Esterilização por vapor. Autoclaves. Indústrias Farmacêuticas.

ABSTRACT

The purpose of this work was to create a methodology for validation and revalidation processes of moist heat sterilization in horizontal autoclaves, emphasizing the critical points of the process and focusing efforts where they are actually required.

Temperature distribution studies, heat penetration studies and microbiological challenge have been carried out through in the validation of the autoclave STERIS FINNAQUA 6912. Aiming the evaluation of the impact of changes and the relationship between factors and their interactions for the sterilization process, the 2^3 factorial design of the factors load density (number of items), product packaging and location in the chamber internal was used.

Temperature distribution studies confirmed the homogeneous heat distribution inside the inner chamber during the exposure time at 121°C. Temperatures ranged between 120.35°C and 120.92°C with maximum standard deviation of 0.12°C.

Heat penetration studies confirmed thermal exposures equivalent to 121°C for 24 minutes on all items of load (F_0 > 24 minutes). In all studies for dry loads, the process capability indexes Cpk were greater than 1.33.

Microbiological challenge tests assured a Sterility Assurance Level (SAL) greater than 12 logarithmic reductions in relation to *Geobacillus stearothermophilus* bioindicators. The presence of surviving spores in 132 bioindicators was not detected

Based on the Design of Experiments (DOE) with the significance level of 95%, the changes in factors position, packaging and quantity of the load were not significant to the process of sterilization in autoclave with vacuum air removal. As for the significance level of 90%, the interaction between position x packing was statistically significant in the sterilization process with P value of 0.080.

Keywords: Steam sterilization. Autoclaves. Pharmaceutical Industries.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

CEP – Controle Estatístico de Processo

CLP – Controlador Lógico Programável

Cp – Capacidade do Processo Centralizado

Cpk – Capacidade do Processo Descentralizado

Cpi – Capacidade do Processo Inferior

Cps – Capacidade do Processo Superior

DF – Descrição Funcional

DOE – *Design of experiments*

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines

EMEA – European Medicines Agency

ERU – Especificação de Requerimento do Usuário

EU GMP – *European Union Good Manufacturing Practice*

FAT – *Factory Acceptance Test*

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GAMP – *Good Automated Manufacturing Practice*

HTM – *Health Technical Memorandum*

ISO – *International Standardization Organization*

ISPE – *International Society for Pharmaceutical Engineering*

LIA – Limite Inferior de Alerta

LIC – Limite Inferior de Controle

LM – Linha Média

LSA – Limite Superior de Alerta

LSC – Limite Superior de Controle

MCA – *Medicines Control Agency*

NBR – Norma Brasileira

OMS – Organização Mundial de Saúde

PDA – *Parenteral Drug Association*

PID – Proporcional Integral e Derivativo

POP – Procedimentos Operacionais Padrão

QD – Qualificação de Projeto

QI – Qualificação de Instalação

QO – Qualificação de Operação

QP – Qualificação de Performance

SAL – *Sterility Assurance Level*

SAT – *Site Acceptance Test*

TRD – Tempo de Redução Decimal

USP – *United States Pharmacopeia*

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de pressão x temperatura de saturação (Fonte: MSPC, 2010).20
Figura 2 - Ciclo de penetração de vapor 20
Figura 3 - Componentes de uma autoclave horizontal (Fonte: Luqueta, 2008). 21
Figura 4 - Ar residual após terceiro pulso de vácuo (Fonte: Baumer, 2004). 22
Figura 5 - Fases do ciclo de esterilização 23
Figura 6 - Classificação das cargas 25
Figura 7 - Gráfico de temperatura de líquidos abertos 26
Figura 8 - Sistema de ventilação forçada. 27
Figura 9 - Gráfico de temperatura de líquidos fechados 28
Figura 10 - Carcaça de um filtro hidrofóbico de 0,2 µm 29
Figura 11 - Formação de endosporos (Fonte: Tortora, 2005). 32
Figura 12 - Gráfico de valor D usando o log dos sobreviventes no eixo y e tempo de exposição no o eixo x. 34
Figura 13 - Gráfico semilogarítimico da curva de sobrevivência. 35
Figura 14 - Gráfico de Valor z. 37
Figura 15 - Relação matemática entre letalidade e temperatura. 38
Figura 16 - Representação gráfica de SAL a 10^{-6} (Fonte: Penna, 2006). 40
Figura 17 - Método de esterilização versus energia térmica na carga (Fonte: PDA, 2002). 42
Figura 18 - Método de esterilização versus custo de manutenção (Fonte: PDA, 2002). 43
Figura 19 - Representação gráfica do método sobremorte (Fonte: PDA, 2002). 44
Figura 20 - Representação gráfica do método combinado (Fonte: PDA, 2002). 46
Figura 21 - Representação gráfica do método carga microbiana total (Fonte: PDA, 2002). 47
Figura 22 - Estrutura básica para especificação e qualificação (Fonte: ISPE, 2008). 52
Figura 23 - Gráfico de Controle 54
Figura 24 - Limite de Alerta 55
Figura 25 - Relação Gráfica entre Cp e Cpk 56
Figura 26 - Modelo de um Processo 57

Figura 27 - Geometria do planejamento e matriz de teste de 2^2. 58
Figura 28 - Geometria do planejamento e matriz de teste de 2^3. 58
Figura 29 - Autoclave STERIS FINNAQUA 60
Figura 30 - Diagrama de blocos típico de sistema de controle 61
Figura 31 - Diagrama de blocos típico de medição de temperatura 61
Figura 32 - Diagrama de blocos de controle proporcional 62
Figura 33 - Sistema de aquisição de dados GE Kaye. 63
Figura 34 - Distribuição dos Sensores de Temperatura. 66
Figura 35 - Indicadores biológicos tipo fita e ampolas. 67
Figura 36 - Fixação dos indicadores biológicos junto aos termopares. 68
Figura 37 - Alteração da cor do indicador biológico de um resultado positivo. 68
Figura 38 - Localização dos pontos quente e frio. 70
Figura 39 - Montagem do planejamento. 71
Figura 40 - Gráfico de temperatura das três corridas com a autoclave vazia. 73
Figura 41 - *Box pot* para as três corridas com autoclave vazia e ciclo seco. 74
Figura 42 - Gráfico de controle para observações individuais e a amplitude móvel do controle da primeira corrida. 75
Figura 43 - Gráfico de controle para observações individuais e a amplitude móvel do controle da segunda corrida. 75
Figura 44 - Gráfico de controle para observações individuais e a amplitude móvel do controle da terceira corrida. 76
Figura 45 - Gráfico de temperatura das três corridas com a câmara vazia no ciclo líquido. 77
Figura 46 - Letalidade mínima acumulada nas 3 corridas vazias. 78
Figura 47 - Letalidade e as temperaturas das tres corridas ciclo 1. 79
Figura 48 - Letalidade e as temperaturas das três corridas ciclo 2. 80
Figura 49 - Gráfico de capacidade do processo - Cpk. 82
Figura 50 - Mapeamento térmico das tres corridas ciclo 3. 83
Figura 51 - Mapeamento térmico das três corridas ciclo 4. Acurva em vermelho demonstra que neste ponto a resistência térmica foi maior. 84
Figura 52 - Letalidade acumulada das três corridas do ciclo 3. 85
Figura 53 - Letalidade acumulada das três corridas do ciclo 4. 86
Figura 54 - Curva da letalidade mínima de cada corrida. 87
Figura 55 - Geometria do planejamento 2^3. 89

Figura 56 - Diagrama de pareto de letalidade e capacidade inferior. 90
Figura 57 - Gráfico do efeito da probabilidade normal da resposta letalidade. 93
Figura 58 - Distribuição dos sensores de temperatura no interior da autoclave para a realização do estudo térmico vazio. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo gasto em média durante a validação de uma carga (Fonte: Bio-Manguinhos, 2010). 18
Tabela 2 – Tempos e temperaturas dos processos de esterilização normalmente utilizados nas indústrias farmacêuticas. Para úmido, T=121°C e z=10°C; para seco, T=170°C e z=20°C (Fonte: AGALLOCO, 2007). 19
Tabela 3 - Normas nacionais 50
Tabela 4 - Materiais utilizados. 64
Tabela 5 - Cargas Secas 64
Tabela 6 - Carga Líquida 65
Tabela 7 - Tabela de Fatores 70
Tabela 8 – Combinações possíveis dos fatores 71
Tabela 9 - Planejamento dos Ensaios 72
Tabela 10 - Resumo do mapeamento térmico da autoclave a 121°C por 20 minutos. 74
Tabela 11 - Resumo do mapeamento térmico das cargas secas 81
Tabela 12 - Analise da capacidade do processo. 81
Tabela 13 – Letalidade máxima e mínima de cada corrida e o tempo de alcance até F_0 = 12 min. 87
Tabela 14 - Resultado do desafio microbiológico das cargas secas e líquidas. 88
Tabela 15 - Resultados do Planejamento 2^3. 89
Tabela 16 - Tabela da Anova de Letalidade e Capacidade (α = 0,05) 91
Tabela 17 - Coeficientes e efeitos da letalidade e capacidade (α = 0,10). 92
Tabela 18 - Matriz de Rastreabilidade 107
Tabela 19 - Efeito de uma variação ±1°C na letalidade acumulada 115

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 17

1. **FUNDAMENTOS TEÓRICOS** 19

1.1. **Processo de Esterilização** 19
1.1.1. Papel do Vapor na Esterilização 19
1.1.2. Seqüência Funcional Básica da Autoclave Horizontal 21
1.1.3. Tipos de Cargas 24
1.1.3.1. Objetivo Final 24
1.1.3.2. Fase da Matéria 24
1.1.3.3. Método de Classificação 25
1.1.4. Particularidades Pertinentes de cada Tipo de Carga 25
1.1.4.1. Ciclos Líquidos de Recipientes Abertos 25
1.1.4.2. Ciclos Líquidos de Recipientes Fechados 27
1.1.4.3. Ciclos de Descontaminação 28

1.2 **Conceitos Microbiológicos** 29
1.2.1. Células Vegetativas 30
1.2.2. Vírus 30
1.2.3. Endosporo 30
1.2.3.1. Formação do Endosporo ou Esporulação 31
1.2.3.2. Germinação 32
1.2.3.3. Lesão Térmica dos Endosporos 33

1.3. Modelo Matemático de Esterilização por Vapor 33
1.3.1. Valor D ou Tempo de Redução Decimal (TRD) 35
1.3.2. Valor z 36
1.3.3. Cálculo de Letalidade Acumulada (Valor F_0) 37
1.3.4. *SAL* (*Sterile Assurance Level*) 38

1.4. Modelos de Esterilização do Vapor **41**
1.4.1. Método de Sobremorte (*Overkill*) 43
1.4.2. Método Combinado Indicador biológico / Carga Microbiana (*Bioburden / Bioindicator Combination*) 45

1.4.3. Método de Carga Microbiana Total (*Absolute Bioburden*) 46

1.5 **Requisito de Normas e Órgãos Regulatórios** 47
1.5.1. Documentos sobre Validação de Esterilização por Vapor 48
1.5.2. Dificuldade para Harmonização 49
1.5.3. Situação no Brasil 50

1.6. **Processo de Validação - Ciclo de Vida de Autoclave** 51
1.6.1. Revalidação 52

1.7 Ferramentas Estatísticas 53
1.7.1. Controle Estatístico de Processo – CEP 53
1.7.1.1. Carta de Controle 53
1.7.1.2. Capacidade do Processo 55
1.7.2. Planejamento Experimental – DOE 57
1.7.2.1. Planejamento Fatorial 57
1.7.2.3. Modelo de Regressão 58

2 **MATERIAIS E MÉTODOS** 60

2.1 **Equipamentos** 60
2.1.1. Autoclave 60
2.1.1.1. Sistema de Controle 60
2.1.1.2. Medição de Temperatura 61
2.1.1.3. Medição de Pressão 62
2.1.1.4. Princípio da Regulagem da Válvula de Controle 62
2.1.2. Sistema de aquisição de dados de temperatura 63

2.2 **Materiais** 63

2.3 **Métodos** 64
2.3.1. Classificação das Cargas 64
2.3.2. Distribuição Térmica da Autoclave 65
2.3.3. Penetração de Vapor na Carga 66
2.3.4. Desafio Microbiológico 67
2.3.5. Cálculo da Capacidade de Esterilização (Cpk) 69

2.3.6. Planejamento Fatorial das Variáveis da Esterilização (2^k) 69

3 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 73

3.1 **Distribuição Térmica na Autoclave** 73
3.1.1. Ciclo Seco 73
3.1.2. Ciclo Líquido 77

3.2. **Penetração de Vapor nas Cargas** 79
3.2.1. Cargas Secas 79
3.2.2. Cargas Líquidas 83

3.3 **Desafio Microbiológico** **88**

3.4 **Planejamento Fatorial 2^3** 89

4 **CONCLUSÕES E SUGESTÕES** 94

4.1 **Conclusões** 94

4.2 **Sugestões para outras Indústrias** 96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **97**

ANEXO A - ESPECIFICAÇÃO DE PROJETO DE UMA AUTOCLAVE **103**

ANEXO B - TESTE DE ACEITAÇÃO DE FABRICA – FAT **108**

ANEXO C - QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO – QI **110**

ANEXO D - QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO – QO **113**

ANEXO E - QUALIFICAÇÃO DE PERFORMANCE – QP **117**

ANEXO F – TRABALHO PUBLICADO NO XVIII COBEQ **123**

INTRODUÇÃO

Joseph Lister (1860) e Ignaz Semmelweis (1847) foram os primeiros cirurgiões a desinfetarem as mãos, instrumentos e o ambiente de operação com objetivo de evitar as infecções durante as cirurgias, surgindo assim a cirurgia anti-séptica, que hoje é chamada de cirurgia asséptica, graças à esterilização por meios físicos e químicos de instrumentos e ambientes cirúrgico (Fontana, 2006). Portanto, pode-se dizer que esterilização é a tentativa física ou química de destruir ou eliminar todas as formas de vida, principalmente os micro-organismos.

Mesmo com o avanço da ciência e tecnologia, hoje, aproximadamente 140 anos depois, continuam existindo casos de infecções hospitalares e produtos contaminados. Isto se deve ao fato da falta de estudos e testes, em algumas empresas e hospitais, que comprovem que os processos de esterilização são realmente eficazes. Com isto destaca-se a importância da qualificação dos equipamentos esterilizadores e da validação dos processos de esterilização.

O processo de esterilização em indústrias farmacêuticas garante assepsia dos materiais utilizados na produção de medicamentos. O método de esterilização a vapor saturado é sempre a primeira escolha nas indústrias farmacêuticas por tratar-se do método mais eficaz, rápido, com melhor relação custo/beneficio e com menor impacto ambiental. A fim de garantir o nível de esterilidade necessário, a qualificação de autoclaves e validação de suas cargas (itens que devem estar estéreis para uso) são requisitos sempre exigidos pelos órgãos regulatórios nacionais e internacionais. Os regulamentos destes órgãos nem sempre são objetivos e claros, muitas vezes sujeitos a interpretações (ANVISA, 2006; OMS, 1997) GAMP. Estes regulamentos regem *o quê* deve ser feito, mas não especificam *como* deve ser feito.

Em muitas indústrias farmacêuticas existem poucas autoclaves, não ultrapassando o quantitativo de cinco autoclaves. Neste caso é possível dedicar mais tempo e recursos aos estudos, ensaios, investigações e relatórios das validações. Logo a seguir, na Tabela 1, está demonstrado o tempo geralmente gasto na validação de uma carga de autoclave.

Tabela 1 - Tempo gasto em média durante a validação de uma carga (Fonte: Bio-Manguinhos, 2010).

Tarefa	Tempo gasto
Calibração dos instrumentos da autoclave	4 h
Calibração do sistema de aquisição de dados antes da validação	2 h
Montagem e configuração da carga	0,5 h
Estudo térmico na carga em três corridas consecutivas	4 h/corrida
Desafio microbiológico em três corridas consecutivas	7 dias de incubação
Calibração do sistema de aquisição de dados depois da validação	2 h
Elaboração do relatório de validação	1 dia

Algumas destas tarefas podem ser feitas simultaneamente, como o estudo térmico da segunda corrida com incubação dos indicadores biológicos da primeira corrida. Entretanto, uma autoclave possui geralmente até 20 cargas distintas que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1997), devem ser revalidadas ao menos uma vez ao ano. Isto se torna inviável logisticamente e economicamente num complexo industrial que possui 40 autoclaves com cerca de 10 cargas cada. Sem levar em conta que segundo a NBR ISO 11134 (2001), uma validação segura e durável requer que alterações somente sejam feitas após avaliação completa dos impactos destas. Se algum fator envolvido causar algum impacto relevante na carga ou autoclave, as mesmas devem ser revalidadas.

O foco deste trabalho é criar uma metodologia de validação, revalidação e controle de mudança em autoclaves horizontais, destacando os pontos críticos do processo, explorando os conceitos teóricos da microbiologia, da termodinâmica e da estatística com o objetivo de concentrar esforços onde são realmente necessários. Neste trabalho serão utilizadas técnicas estatísticas para análise de dados coletados em estudo de distribuição térmica, penetração de calor e desafios microbiológicos visando determinar um método rápido, seguro e eficaz que atenda às exigências dos órgãos regulatórios sem afetar a capacidade de produção das plantas industriais e a qualidade do processo de esterilização.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. Processo de Esterilização

1.1.1. Papel do Vapor na Esterilização

A esterilização por calor é amplamente utilizada na indústria farmacêutica. A Tabela 2 mostra as equivalências de letalidade entre as diferentes temperaturas com os respectivos tempos de exposição dependendo do método de esterilização utilizado (calor úmido ou calor seco). Comparando por método, matematicamente todos os parâmetros têm o mesmo potencial de esterilização. Pode-se concluir que a esterilização na presença do vapor é mais eficaz, pois requer menos tempo e temperatura que o calor seco.

Tabela 2 – Tempos e temperaturas dos processos de esterilização normalmente utilizados nas indústrias farmacêuticas. Para úmido, T=121°C e z=10°C; para seco, T=170°C e z=20°C (Fonte: AGALLOCO, 2007).

	CALOR ÚMIDO			*CALOR SECO*		
Temperatura	**115°C**	**121°C**	**134°C**	**160°C**	**170°C**	**180°C**
Tempo	**30 min**	**15 min**	**3 min**	**380 min**	**120 min**	**40 min**

Segundo a fabricante de autoclaves Indústrias Baumer S.A. (2004), isto se deve ao fato que à medida que a água é aquecida, mais energia é absorvida ao ponto da temperatura elevar-se até o estado de ebulição (calor latente). Esta energia não é usada apenas para o aumento da temperatura, mas sim para transição da fase líquida para a gasosa. A energia gasta nesta transição é muito elevada, fazendo que no processo inverso – condensação – a energia obtida seja também muito alta, confirmando que a esterilização por calor na presença do vapor apresenta alto rendimento (menor tempo e temperatura). Este rendimento pode ainda ser maior, caso a pressão interna da câmara seja mantida acima da pressão atmosférica, pois o ponto de ebulição passa ser maior que 100°C. Este é o caso das autoclaves industriais que trabalham com a pressão relativa em torno 1,1 kgf/cm² fazendo que a ebulição da água seja próxima a 121°C. Na figura 1, as linhas cheias indicam condições de pressão e temperatura onde as duas fases podem coexistir. Para água nas condições normais de pressão, a temperatura de saturação é 100°C

(ebulição). A temperatura de saturação aumenta com a pressão, mas há um limite, denominado ponto crítico, acima do qual não há transição definida entre as duas fases.

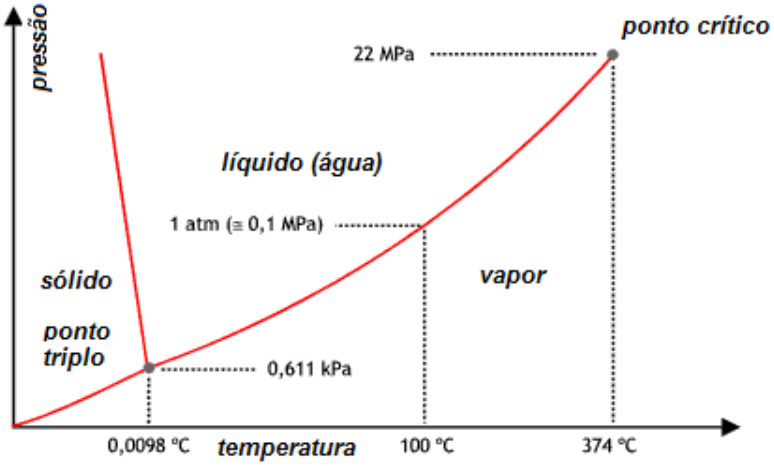

Figura 1 - Diagrama de pressão x temperatura de saturação (Fonte: MSPC, 2010).

Outro aspecto importante, ilustrado na figura 2, são as expansões que ocorrem quando a água passa para a fase gasosa e as contrações quando volta à fase líquida. O vapor sofre uma contração instantânea de volume (na ordem de 1.500 vezes) ao condensar e umedecer a superfície do produto. Isso faz com que a penetração de vapor nos poros e frestas do objeto a ser processado, seja potencializada através do efeito de “bomba de vácuo”. Este efeito capta mais vapor, que continua aquecendo o produto e condensando-se. Ao condensar-se, o vapor cria um vácuo parcial que tende a ser ocupado por mais vapor, que, por sua vez, traz mais energia. Dessa maneira, cumpre-se um ciclo. Este fenômeno sucessivo é também chamado de “bomba de calor” (Luqueta, 2004).

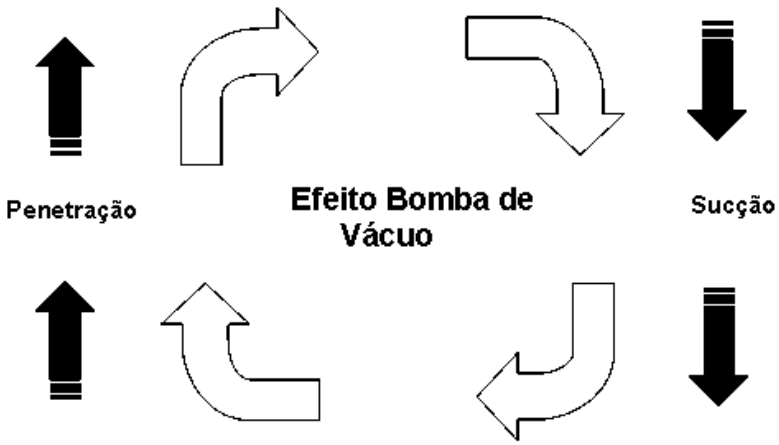

Figura 2 - Ciclo de penetração de vapor

1.1.2. Seqüência Funcional Básica da Autoclave Horizontal

A autoclave horizontal é basicamente a combinação de dois vasos de pressão hermeticamente fechados, sendo que um está contido no outro. O vaso externo é chamado de câmara externa, mas também é conhecido como camisa ou jaqueta. O vaso interno é o lugar onde acomoda a carga para esterilização e é chamado de câmara interna. A figura 3 mostra o diagrama básico de uma autoclave horizontal de duas portas e seus principais componentes. A função das duas portas é eliminar o risco de contaminação cruzada, criando um fluxo de material sempre do lado mais sujo para o lado mais limpo.

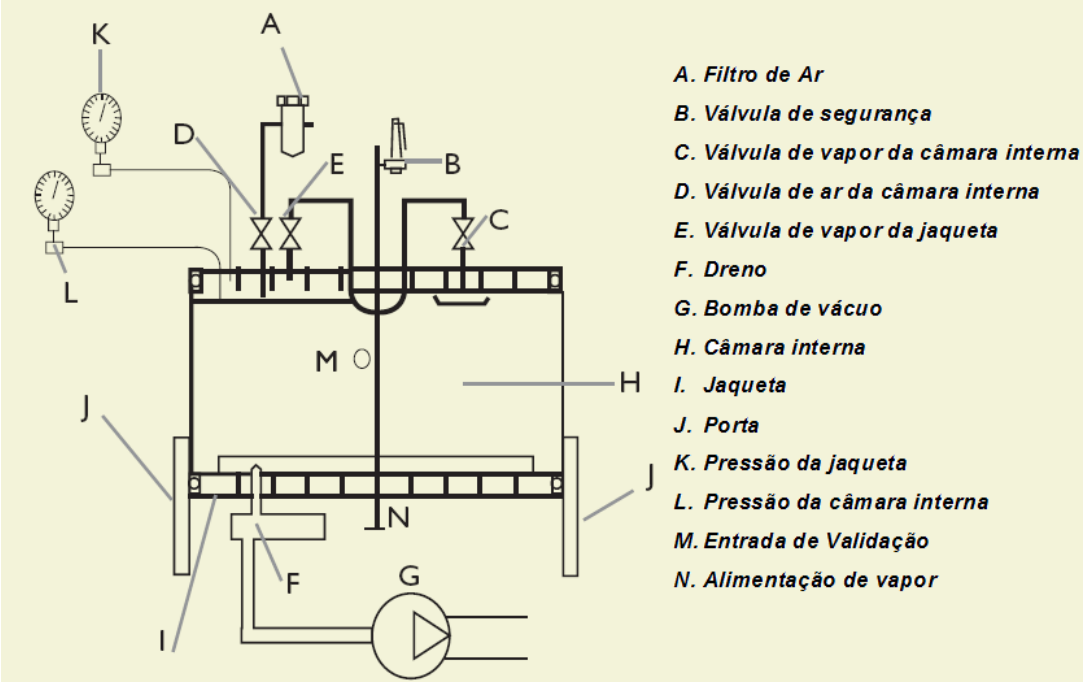

Figura 3 - Componentes de uma autoclave horizontal (Fonte: Luqueta, 2008).

Quando se liga a autoclave, a válvula E abre, deixando o vapor proveniente da fonte N entrar na câmara externa. A principal função da câmara externa é aquecer as paredes internas da câmara, evitando a formação de condensado durante a injeção de vapor na câmara interna. A câmara externa aquecida também auxilia na fase de secagem, irradiando a calor a carga.

Ao fecharem as portas J, a fase de pré-condicionamento é iniciada. Esta fase apresenta duas subfases, pré-vácuo e rampa de aquecimento. O pré-vácuo consiste na remoção do ar na câmara interna através de ciclos repetitivos de pulsos de vácuo alternados com injeção de vapor. No primeiro instante desta subfase a bomba de

vácuo G é ligada até que a câmara interna H atinja 730 mmHg de vácuo. Após atingir o vácuo, a bomba de vácuo é interrompida e a válvula C de entrada de vapor na câmara interna é aberta até que a pressão interna se equalize com a pressão atmosférica, concluindo assim um pulso de vácuo. Na prática, esta fase é repetida três vezes, pois, de acordo com a figura 4, o terceiro pulso de vácuo já garante uma remoção de 99,994% do ar no interior da câmara.

1° Vácuo

$$\left(1-\frac{730mmHg}{760mmHg}\right)\times 100 = 4\%$$

Ar residual = 4%

2° Vácuo

4% de 4%

Ar residual = 0,16%

3° Vácuo

4% de 0,16%

Ar residual = ***0,006%***

Figura 4 - Ar residual após terceiro pulso de vácuo (Fonte: Baumer, 2004).

Os pulsos de vácuo, além de removerem o ar presente no sistema, também têm a finalidade de aquecer a carga antes da injeção definitiva de vapor, diminuindo a formação de condensado e, conseqüentemente, facilitando a secagem final. É fundamental a eliminação do ar dentro da câmara, pois o ar é considerado um dos melhores isolantes térmicos, o que dificulta a homogeneidade térmica na câmara e a penetração de vapor na carga. A subfase seguinte ao pré-vácuo é a rampa de aquecimento, onde o vapor é injetado pela válvula C até que seja alcançada a temperatura de exposição a 121°C. Nesta fase um sensor de temperatura instalado no dreno F abre a válvula C até que a temperatura de esterilização alcance 121°C.

A fase seguinte é tempo de exposição, onde a temperatura é mantida a 121°C por um tempo determinado. Nesta fase um sensor de temperatura instalado no dreno F modula a válvula C e E em torno de 1,1 kgf/cm², para que a temperatura de esterilização permaneça próxima a 121°C (caso fosse mantida a 134°C, a pressão deveria ser modulada a 2,1 kgf/cm²). O dreno é o melhor lugar para controle de temperatura, pois o ar e o condensado (mais denso que o vapor) são removidos por gravidade pelo dreno localizado no fundo da câmara, transformando-o no ponto mais

frio da câmara. Se o dreno estiver a 121°C, espera-se que os demais pontos no interior da câmara estejam a temperaturas maiores ou iguais a 121°C.

A ultima fase do ciclo de esterilização é o pós-condicionamento, que também apresenta duas subfases: secagem e aeração. Na secagem, o sistema de vácuo é ligado enquanto que a válvula de admissão de vapor é fechada, criando-se novamente vácuo na câmara interna. A presença do vácuo junto à radiação de calor proveniente das paredes da câmara, devido à injeção de vapor na câmara externa, faz com que o vapor e o condensado da câmara interna sejam retirados. A subfase de secagem consiste basicamente em deixar a bomba ligada por um tempo determinado. Após o tempo de secagem, a subfase de aeração consiste na equalização da pressão interna com a pressão atmosférica, admitindo-se ar externo. Nesta fase, a bomba de vácuo é interrompida e a válvula de aeração D é aberta, quebrando o vácuo no interior da câmara através do ar que passa pelo filtro A. A qualidade e a correta manutenção do filtro de aeração são vitais para o sucesso da esterilização, já que a injeção de ar contaminado ao final do ciclo compromete todo o processo de esterilização. Estas fases podem ser observadas na figura 5.

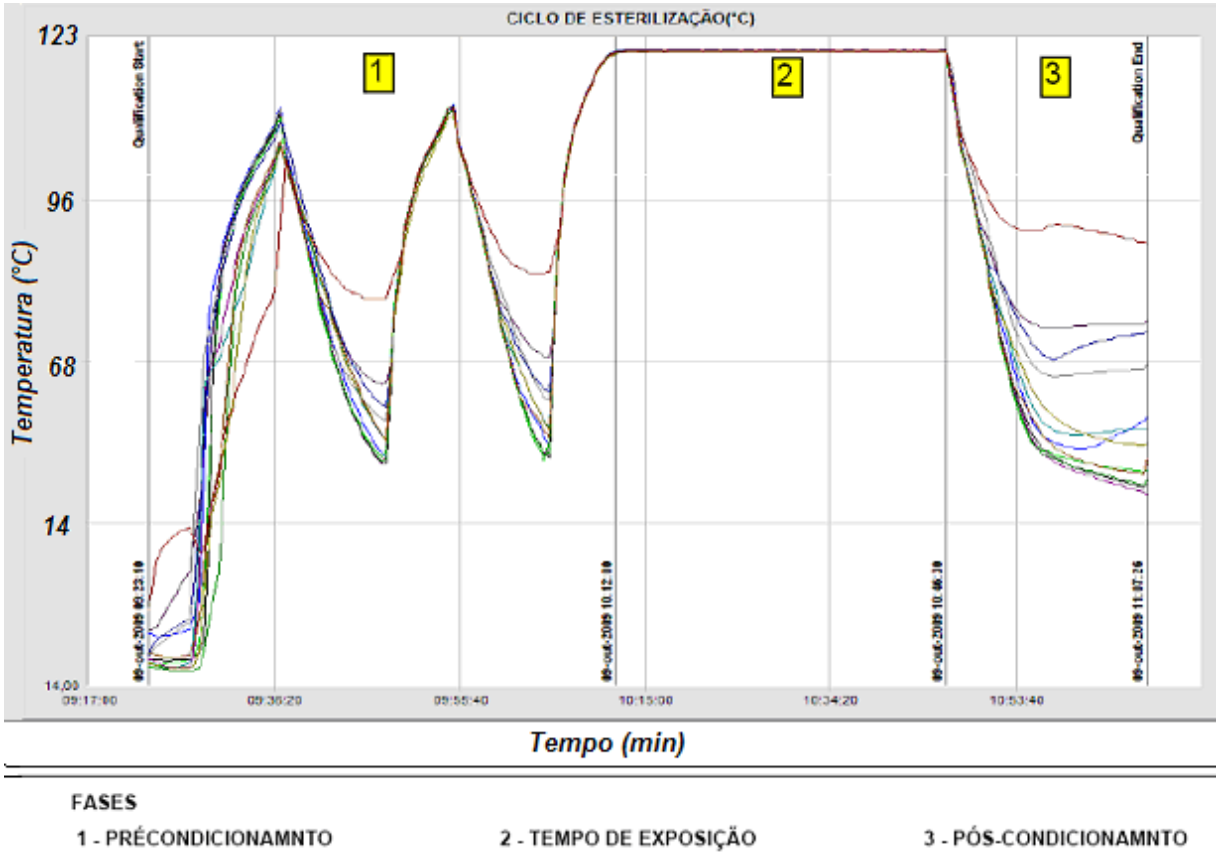

Figura 5 - Fases do ciclo de esterilização

1.1.3. Tipos de Cargas

As cargas das autoclaves podem ser classificadas de duas maneiras. De acordo com seu com seu **objetivo final** e **fase da matéria**.

1.1.3.1. Objetivo Final

O termo objetivo final refere-se à finalidade da carga. Se o material for utilizado para manipulação do produto num ambiente estéril (sala limpa ou capela de fluxo laminar) ou na formulação dos ingredientes do produto, o processo é chamado de **Esterilização**. Se o material for classificado como Resíduo de Serviço de Saúde – RSS, que geralmente são restos de produção que teve contato com material biológico e precisa ser descartado, são chamados de processo de **Descontaminação** (ANVISA, 2006).

1.1.3.2. Fase da Matéria

O termo fase da matéria refere-se às fases sólida e líquida dos itens da carga. Na prática são chamadas de cargas secas (que se subdividem em sólidas e porosas) e cargas líquidas (que também se subdividem em hermeticamente abertas e hermeticamente fechadas).

As cargas secas porosas têm o objetivo de colocar o vapor em contato com micro-organismo através de seus poros e/ou suas embalagens. Há necessidade de remoção do ar, penetração do vapor, saída do vapor e revaporação da umidade do material, como por exemplo, vestimentas, vidrarias embaladas, mangueiras.

As cargas secas sólidas têm o objetivo de colocar o vapor em contato direto com a superfície da carga, como por exemplo, aros e bandejas.

Os processos usados para materiais sólidos ou cargas porosas têm em comum o objetivo de colocar o vapor em contato com micro-organismo. Para líquidos, o objetivo é diferente. O próprio líquido é usado como agente esterilizante. Portanto o vapor é usado apenas para aquecer uniformemente o líquido.

1.1.3.3. Método de Classificação

A figura 6 mostra as possíveis combinações entre as categorias para classificar as cargas.

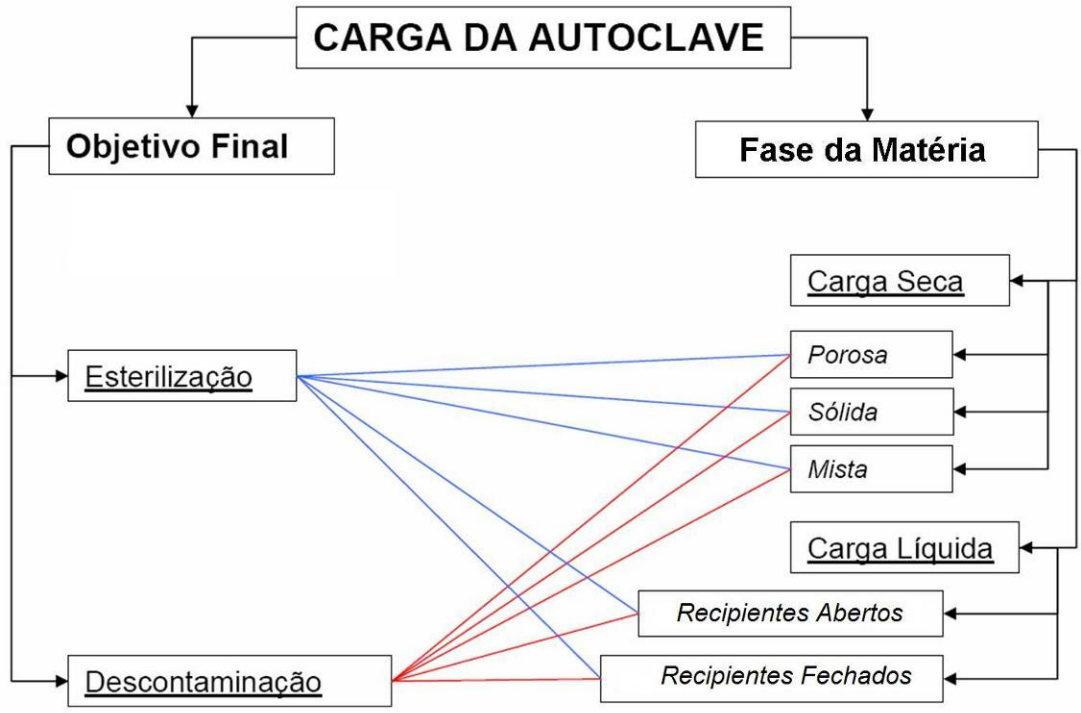

Figura 6 - Classificação das cargas

O processo de esterilização de cargas secas é basicamente o mesmo processo descrito no item seqüência funcional básica da autoclave horizontal (1.1.2), mas para cada tipo de carga, existem particularidades pertinentes nas fases pré-condicionamento, tempo de exposição e pós-condicionamento.

1.1.4. Particularidades Pertinentes de cada Tipo de Carga

1.1.4.1. Ciclos Líquidos de Recipientes Abertos

Como pode ser observados na figura 7, durante a fase de pré-condicionamento, os ciclos de carga líquida de recipientes abertos não podem conter pulsos de vácuo, pois o calor irradiado da câmara interna, combinado com a baixa pressão, causa uma ebulição precoce que conseqüentemente provoca a diminuição do volume por evaporação. Contudo é possível executar meio pulso de vácuo (380 mmHg), desde que os líquidos estejam frios no início do ciclo. Para

garantir menor volume de ar na câmara interna, depois deste meio pulso, executa-se uma descarga de vapor fluente para criar um arraste do resíduo de ar através do dreno. Logo depois se inicia a fase de Tempo de Exposição, onde a temperatura é monitorada pelo sensor de carga e não o sensor de dreno. O sensor de carga é uma sonda (termorresistência PT100) que é inserida na carga líquida ou num recipiente chamado de guia. A duração desta fase pode ser incrementada de duas maneiras. A primeira por tempo, onde a contagem do tempo de exposição programada é iniciada quando a sonda de carga atinge 121°C. A segunda seria por letalidade acumulada ou F_0, onde tempo de exposição é finalizado quando a letalidade atinge o valor programado (o termo F_0 será mais discutido no item 1.3).

Durante a fase de esterilização, a contagem do ciclo por F_0 nem sempre chega a 121°C, pois dependendo da inércia térmica da carga, a letalidade é alcançada antes mesmo que a temperatura da carga atinja 121°C. Durante a fase de pós-condicionamento, o líquido é resfriado com pulsos de ar comprimido seco. A qualidade deste ar é vital para o sucesso da esterilização, pois caso esteja contaminado, a carga pode não sair estéril. O ciclo pode ser concluído e a câmara despressurizada somente se as temperaturas de todos os recipientes líquidos estiverem menores que 100°C, caso contrário, os líquidos entrarão em ebulição instantânea.

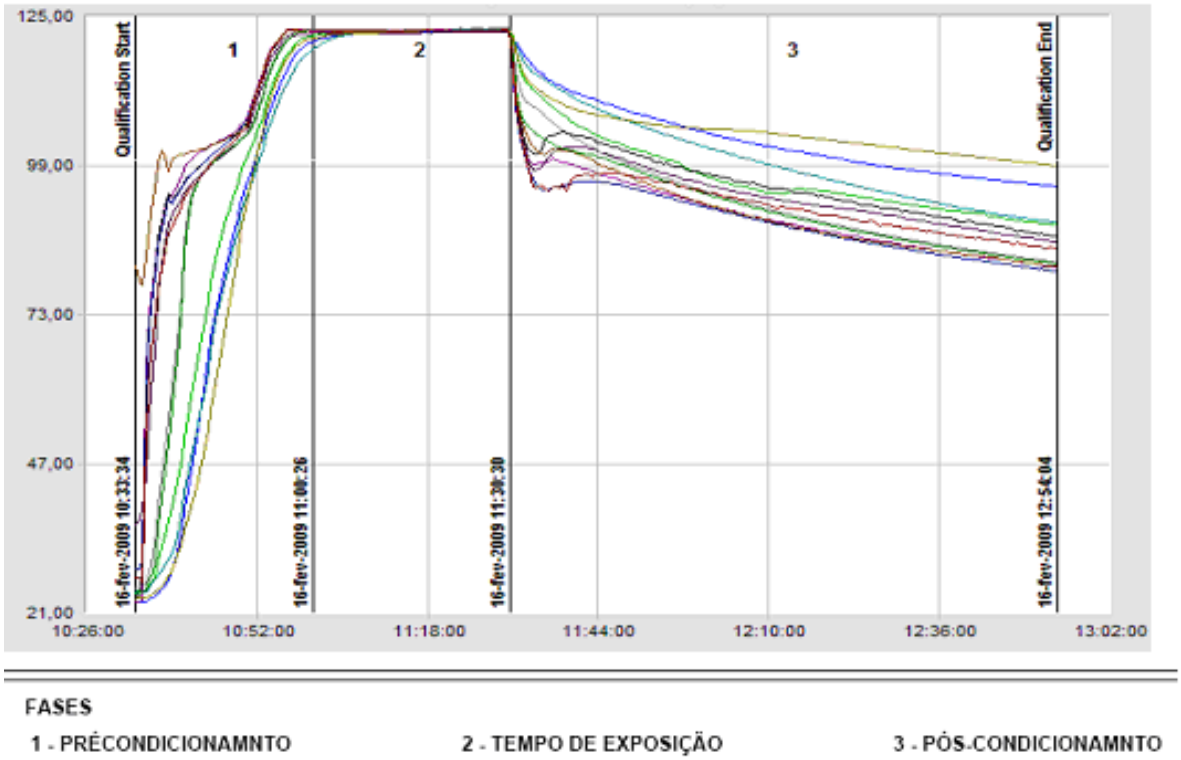

Figura 7 - Gráfico de temperatura de líquidos abertos

1.1.4.2. Ciclos Líquidos de Recipientes Fechados

Frascos selados com tampa e ampolas são exemplos de líquidos de recipientes fechados. Durante a fase de pré-condicionamento, este tipo de ciclo também não pode conter pulsos de vácuo, pois o diferencial de pressão entre o recipiente e a câmara, combinado com aquecimento abrupto do ar internos do recipiente, provoca o seu rompimento. O ar residente no interior dos recipientes aquece mais rápido que o líquido, devido a sua massa e calor específicos serem menores que os do líquido (Baumer, 2004). Com isso a pressão interna do recipiente fica maior que a pressão da câmara provocando tensões elevadas nos recipientes durante a esterilização. As ampolas de vidro criam fissuras ou explodem e os frascos perdem as tampas. Em razão disto, é injetado ar comprimido seco para criar o efeito de contrapressão para diminuir o diferencial de pressão, evitando assim tensões nas paredes dos recipientes. Contudo isto cria um problema de uniformidade térmica no aquecimento, já que o ar introduzido pode formar zonas frias no interior da câmara. Por isto, a autoclave deve conter, conforme a figura 8, um sistema de ventilação forçada (ventiladores) que promovem a homogeneidade térmica.

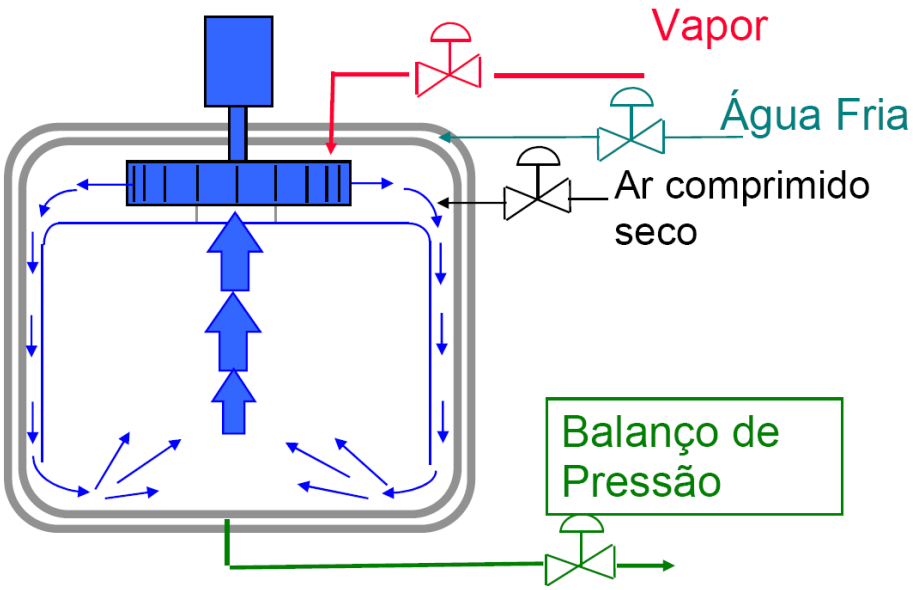

Figura 8 - Sistema de ventilação forçada.

Um processo similar de tensões nos recipientes acontece no pós-condicionamento quando são resfriados rapidamente. Nesta fase o vapor da camisa é substituído por água fria e simultaneamente o vapor da câmara interna é substituído por ar comprimido seco, a fim de criar uma contrapressão e resfriar os recipientes

rapidamente. O ciclo só pode permitir a abertura das portas se a temperatura dos recipientes estiver abaixo de 100°C (geralmente é padronizado em 90°C), caso contrário, o liquido no seu interior entra em ebulição instantânea. Este fenômeno provoca tensões elevadas nos recipientes e tampas. Os recipientes de vidro têm boa resistência mecânica a tais tensões, mas não podem evitar que a tampa sofra movimentos. Se isso ocorrer, haverá a conseqüente perda da hermeticidade, a qual aumentará a probabilidade de recontaminação durante ou após a esterilização. A figura 9 mostra uma curva característica deste ciclo.

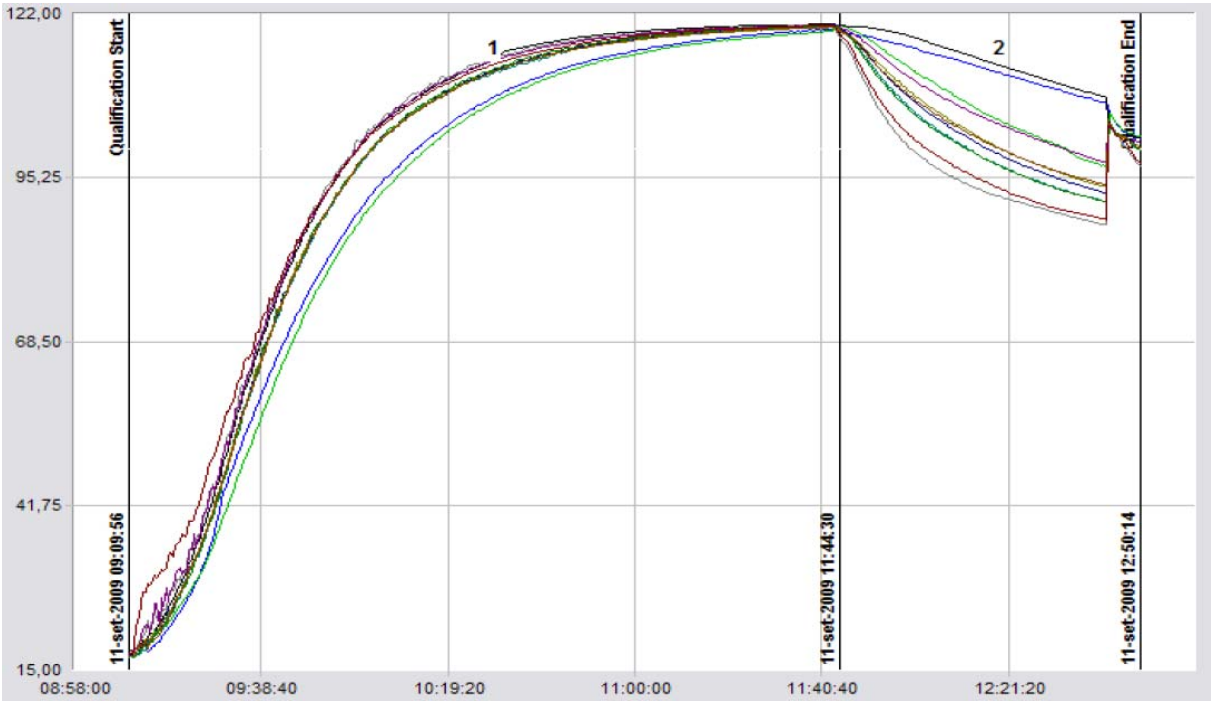

Figura 9 - Gráfico de temperatura de líquidos fechados

1.1.4.3. Ciclos de Descontaminação

A única particularidade existente num ciclo de descontaminação é a necessidade de tratamento de efluentes. Neste tipo de ciclo há uma precaução com as primeiras purgas de condensado na fase de Pré-condicionamento, pois se considera que qualquer efluente descartado antes de finalizado o tempo de exposição seja tratado como resíduo contaminado (ANVISA, 2006). No dreno da autoclave há instalado um filtro hidrofóbico de 0,2 µm que retêm qualquer possível micro-organismo. Este filtro é esterilizado automaticamente por vapor fluente a 121°C. Ele está ilustrado na figura 10.

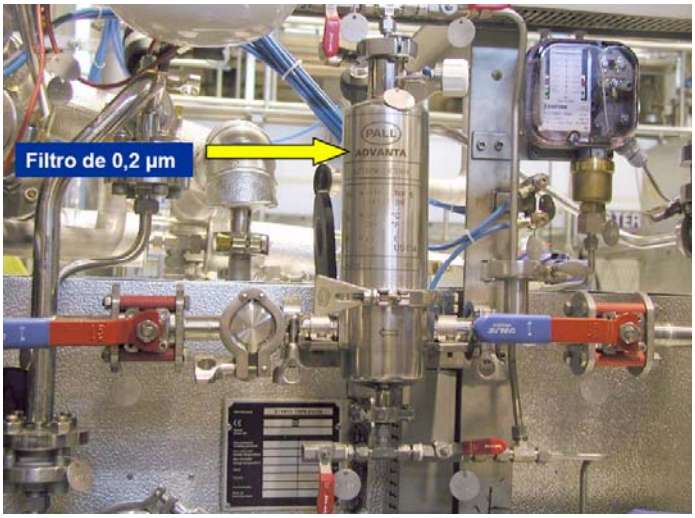

Figura 10 - Carcaça de um filtro hidrofóbico de 0,2 µm

1.2. Conceitos Microbiológicos

Segundo Agalloco (2007), os micro-organismos estão presentes em toda a parte e seus habitats naturais são extremamente diversificados. Eles sobrevivem em grandes faixas de temperatura, pH, concentração de sais, quantidade de água e nutrientes, mas para indústria farmacêutica eles são extremamente prejudiciais e representa grandes riscos para a qualidade e segurança dos medicamentos. Portanto, a esterilização nos processos farmacêuticos é uma etapa muito importante no processo produtivo que deve estar bem fundamentada nos conceitos microbiológicos.

Quando expomos o micro-organismo a condições estressantes, com objetivo de esterilizá-lo, os resultados podem variar dependendo do agente esterilizante. Além disso, cada agente esterilizante tem um mecanismo específico de esterilização (Russel, 2004). Este trabalho é dedicado à esterilização por calor úmido utilizando vapor como agente esterilizante, não se aplicando aos outros tipos de agentes como, por exemplo, calor seco, óxido de etileno, agentes químicos e radiação.

Não há uma temperatura especifica para executar uma esterilização, embora seja utilizado amplamente nas indústrias o valor de 121,1°C (correspondente a 250°F). O tempo necessário para atingir a esterilização microbiana depende do tempo que o micro-organismo é submetido a uma temperatura específica e da resistência térmica do micro-organismo. Assim, a utilização de uma temperatura mais baixa, como 100°C, requer um longo período de exposição para atingir o

equivalente a uma temperatura mais elevada, por exemplo, 121,1°C. Em resumo, elevadas temperaturas de exposição exigem menores tempos de exposição e baixas temperaturas de exposição requerem maior tempo de exposição (tabela 2). Ambos, entretanto, podem ser utilizados e validados para conseguir a esterilização microbiológica.

1.2.1. Células Vegetativas

As células vegetativas têm pouca resistência ao aquecimento. Segundo Tortora (2005), a maioria das células vegetativas é morta por temperatura acima de 70°C.

1.2.2. Vírus

A maioria dos vírus é destruída a exposição de 60°C por aproximadamente 20 minutos, com desnaturação inicial de DNA em aproximadamente 45°C (Tortora, 2005).

1.2.3. Endosporo

O endosporo ou esporo bacteriano são estruturas especiais formadas no interior das células de algumas espécies de bactérias, quando submetidas a um ambiente hostil (Madigan,2004). Quando ocorre uma condição de estresse, algumas bactérias têm a habilidade de desenvolver estruturas que lhes dão capacidade de sobreviver neste ambiente hostil. Elas são envolvidas por uma espécie de armadura chamada de endosporo ou esporos bacterianos. Quando as condições tornam-se novamente ideais para o crescimento, os endosporos germinam e criam novas células vegetativas (Clontz, 2009).

Os esporos de bactérias são diferentes de esporos de fungos. Os esporos de fungos fazem parte do ciclo normal de reprodução e não são resultados de uma condição adversa e, portanto, não são resistentes (Tortora, 2005).

Endosporo têm maior resistência ao calor úmido. Embora os endosporos verdadeiros sejam encontrados em bactérias Gram-positivas, uma espécie de Gram-negativa, *Coxiella burnetti*, o agente causador da febre Q, forma estrutura

semelhantes aos endosporos que resistem ao calor. A espécie mais utilizada para desafiar o calor úmido, devido sua grande resistência, é o micro-organismo *Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953*. Segundo a *United States Pharmacopeia* (USP, 2009), os endosporos são os micro-organismos com maiores chances de sobreviver na esterilização por calor úmido. Eles são geralmente usados em estudos de validação, representando o "pior caso" no desafio microbiológico.

O nível de resistência à esterilização por calor úmido é geralmente representado pelo *valor D* (tempo de redução decimal) ou *valor z* (relação da taxa de inativação microbiana com a variação da temperatura). Eles permitem determinar a sensibilidade de diferentes esporos de bactérias para processos de esterilização por calor úmido. Os valores D, z e outros modelos matemáticos serão mais discutidos no item 1.3.

1.2.3.1. Formação do Endosporo ou Esporulação

O processo de formação de endosporos dentro de uma célula vegetativa leva várias horas e é conhecido como esporulação ou esporogêneses. Segundo Tortora (2005) as bactérias que formam endosporos começam a esporulação quando fontes de carbono e nitrogênios tornam-se escassas ou indisponíveis. No primeiro estágio da esporulação, um cromossomo bacteriano recém-replicado e uma pequena porção de citoplasma são isolados por um crescimento da membrana plasmática para dentro, denominado septo do esporo. O septo do esporo torna-se uma membrana dupla que circunda o cromossomo e o citoplasma. Essa estrutura, inteiramente fechada dentro da célula original é chamada de pré-esporo. Camadas espessas de peptideoglicana são dispostas entre as duas lâminas da membrana. Então, uma espessa camada de proteína se forma em torno da membrana externa. Este revestimento é responsável pela resistência térmica do esporo. Segundo Levinson (2005), tal resistência se deve ao ácido dipicolínico, um quelante de cálcio, encontrado somente nos esporos.

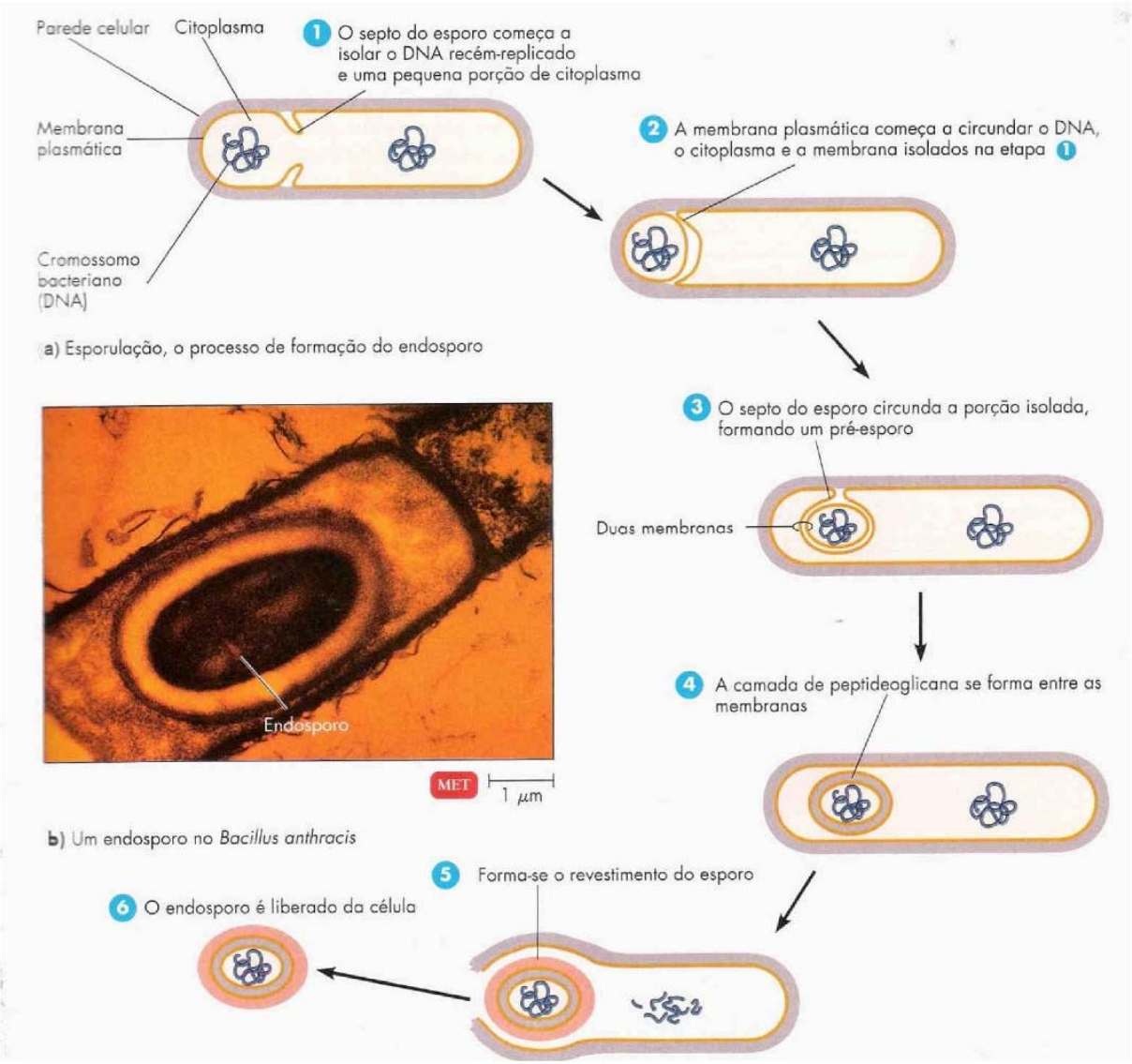

Figura 11 - Formação de endosporos (Fonte: Tortora, 2005).

1.2.3.2. Germinação

Quando liberados no ambiente, o endosporo pode sobreviver a temperaturas extremas, falta de água e exposição a muitas substâncias tóxicas e radiação. Por exemplo, endosporos com 7500 anos de *Thermoactiomyces vulgaris* do lodo congelado do Lago Elk, no estado norte-americano de Minnesota, voltaram ao metabolismo normal quando reaquecidos e colocados em um meio com nutriente (Tortora, 2005).

Um endosporo retorna ao metabolismo normal (célula vegetativa) por um processo denominado germinação. A germinação é ativada por uma lesão física ou química do revestimento do endosporo. Então as enzimas dos endosporo rompem

os peptideoclicanos, captam a água, liberam o ácido dipicolínico e recomeça o metabolismo. Como uma célula vegetativa forma um único endosporo que, após a germinação, permanece uma célula, a esporulação em bactérias não é um meio de reprodução (Tortora, 2005).

1.2.3.3. Lesão Térmica dos Endosporos

O calor úmido mata os micro-organismos principalmente pela coagulação das proteínas. A água auxilia o rompimento das ligações não-covalentes, como por exemplo, as pontes de hidrogênio (desnaturação) que mantêm as proteínas em sua estrutura tridimensional (Tortora, 2005). Entretanto, segundo Levinson (2005), danos na membrana e hidrólise enzimática do DNA também podem estar envolvidos.

Segundo as Indústrias Baumer (2004) o mecanismo geral microscópico pelo qual atua o vapor sobre um micro-organismo consiste no aquecimento por transferência de calor (por convecção) na parede celular. Ao ceder sua energia, o vapor aquece o material e produz umidade na parede celular do micro-organismo a ser destruído (isto é essencial para a eficiência do processo). Nestas condições há uma grande contração de volume. Com isso é produzido vácuo que ativa a penetração de mais vapor.

1.3. Modelo Matemático de Esterilização por Vapor

Graça ao conhecimento da cinética química é possível utilizar modelos matemáticos para estimar os comportamentos microbianos na esterilização por calor vapor. A introdução da teoria cinética química ao chão de fabrica das indústrias trouxe resultados satisfatórios para o entendimento da esterilização, bem como para o desenvolvimento industrial do processo. Segundo Luqueta (2004), estima-se que a morte da maioria dos micro-organismos pela ação do calor seja a resultante de uma reação de primeira ordem.

Para demonstrar este comportamento foi utilizado o modelo proposto por Rahn (1945) que calcula a cinética de morte térmica das bactérias (Luqueta, 2004).

$$\frac{dN}{dt} = -KN \qquad (1)$$

Em que:

N = População inicial de micro-organismo;

t = Duração do tratamento térmico;

K = constante (taxa de reação).

Reorganizando-se a equação (1) e integrando-se, tem-se:

$$\int \frac{dN}{N} = -K \int dt \qquad (2)$$

Convertendo em logaritmo de base 10:

$$\log N = -Kt + C \qquad (3)$$

Assumindo que no tempo zero a população inicial é igual a N_0, a constante C é igual a $\log N_0$ e equação (3) assume a forma:

$$\begin{aligned} &\log N = \log N_0 - Kt \\ &\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -Kt \\ &\frac{N}{N_0} = 10^{-Kt} \end{aligned} \qquad (4)$$

Onde N é o número micro-organismo no instante t. Segundo Agalloco (2007), esta equação é chamada de curva de sobrevivência semilogarítmica de Rahn, onde é possível desenvolver duas das principais variáveis no tratamento matemático de destruição dos micro-organismos: o valor D e o valor z. Se traçarmos o logaritmo da fração de sobreviventes ($\log(N/N_0)$) em função do tempo de exposição, a curva de sobrevivência será linear com a inclinação negativa de K / 2,303 (figura 12).

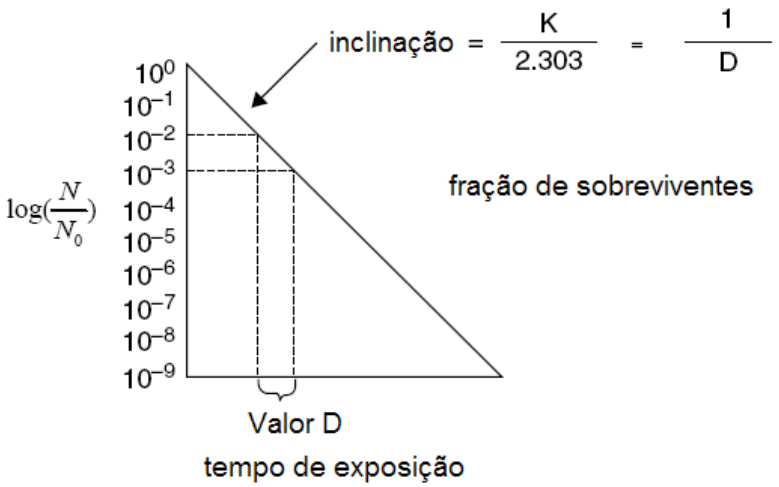

Figura 12 - Gráfico de valor D usando o log dos sobreviventes no eixo y e tempo de exposição no o eixo x.

1.3.1. Valor D ou Tempo de Redução Decimal (TRD)

O valor D é definido como tempo de exposição necessário, após o processo atingir as condições pré-definidas, para causar uma redução 90% na população de um determinado micro-organismo (ISO 11134: 2001). Algumas literaturas referem-se ao valor D como o tempo de redução decimal (TRD). Todos os valores D são específicos para uma temperatura, meio e um determinado micro-organismo. Geralmente são expressos para 121°C, mas nada impede que sejam expressos a qualquer temperatura. Este procedimento é representado graficamente na figura 12 e calculado pela seguinte equação (Russell, 2004):

$$ValorD = \frac{\Delta t}{\log N_0 - \log N} \tag{5}$$

Em que:

Δt = Duração do tratamento térmico

N_0 = População inicial de micro-organismo

N = População final de micro-organismo

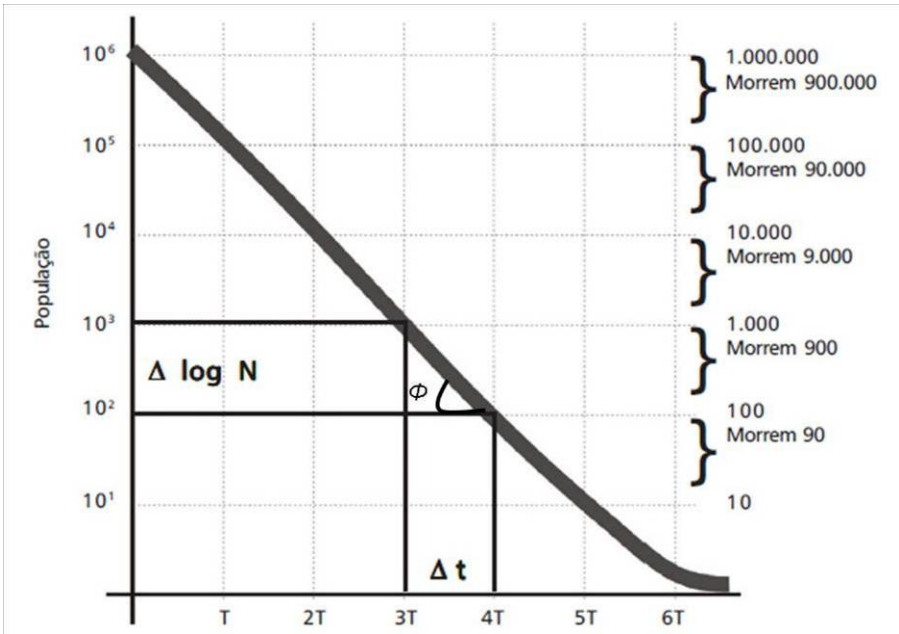

Figura 13 - Gráfico semilogarítimico da curva de sobrevivência.

Pela figura 13, pode-se concluir que:

$$tg\phi = \frac{\Delta \log N}{\Delta t} \tag{6}$$

Assumindo que ΔlogN é -1 redução logarítima teremos:

$$tg\phi = \frac{-1}{\Delta t} \tag{7}$$

Considerando-se que a constante K da figura 12 que representa o grau de inclinação da reta:

$$K = \frac{-2{,}303}{\Delta t} \Rightarrow D = \Delta t \Rightarrow D = \frac{-2{,}303}{K} \tag{8}$$

Por ser uma expressão difícil de trabalhar, devido a sua unidade de medida ser **"-min^{-1}"**, o termo mais usado é valor D. Ele representa uma redução logarítmica que é expressa por número positivo.

O valor D se altera em função da temperatura, portanto, para cada temperatura de exposição é especificado um valor D diferente, por exemplo, $D_{121°C}$ = 0,2 min ou $D_{100°C}$ = 26 min.

1.3.2. Valor z

As determinações do valor D geralmente são realizadas sob condições isotérmicas, mas foi provado experimentalmente que a resistência de um micro-organismo pode mudar com a variação de temperatura (Agalloco, 2007). Esta mudança na taxa de inativação microbiana com uma mudança na temperatura é chamada de valor de z e é definido como número de graus (Celsius) necessários para aumentar ou diminuir uma determinada temperatura para produzir um aumento ou diminuição de 10 vezes no tempo de esterilização. (ISO 11134: 2001).

Segundo Luqueta (2004), se esboçarmos o valor de log D em diferentes temperaturas em um gráfico semilogarítmico conforme a figura 14, obtem-se uma linha reta. A inclinação dessa reta determina o valor z. A principal função deste modelo obtida por forma empírica por Bigelow (1921) é relacionar a redução logarítima da população em função da temperatura (Ocio, 1994). O valor z é utilizado na determinação do calculo de letalidade que será visto mais adiante. O cálculo e a determinação do valor z não são muito adequados acima de 135°C e não é aconselhada sua extrapolação (Baumer, 2004). Para fim de validação, foi padronizado nas indústrias farmacêuticas o valor z igual a 10.

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} \tag{9}$$

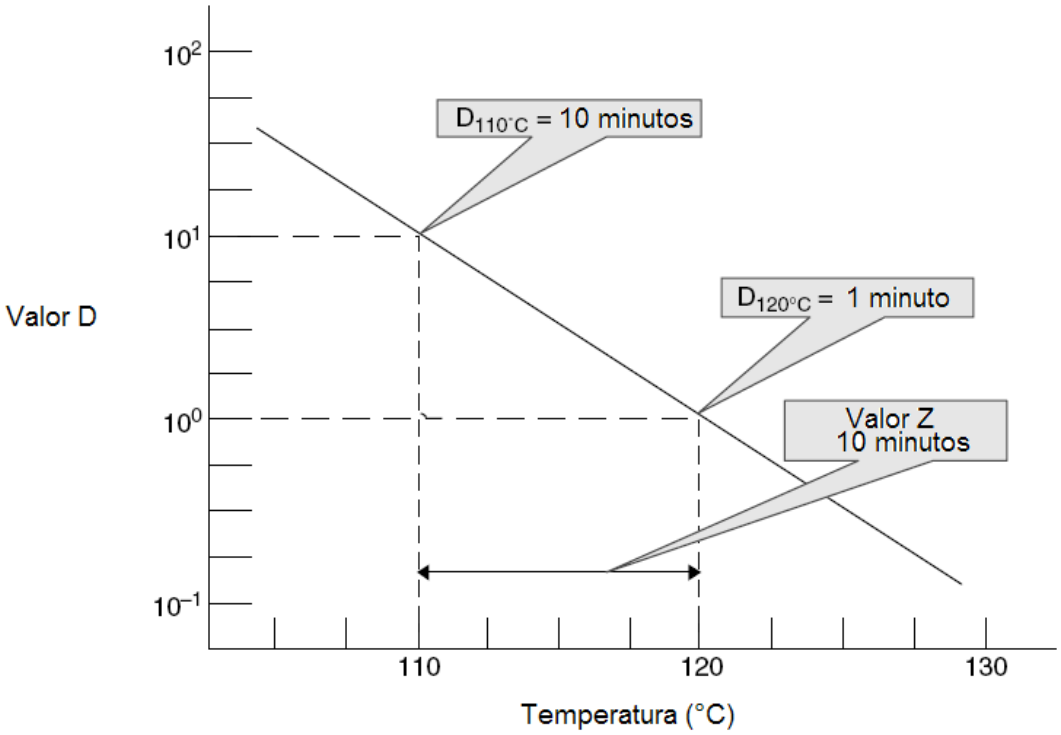

Figura 14 - Gráfico de Valor z.

1.3.3. Cálculo de Letalidade Acumulada (Valor F_0)

Assim como a grandeza física temperatura possui a unidade de medida ***grau Celsius (°C)***, pode-se dizer que a esterilização por vapor também possui sua própria unidade de medida. Esta unidade que quantifica a esterilização é chamada Letalidade (F_{ZERO} ou F_0) que é expressa em minutos. Ao primeiro contato, estranha-se mensurar a letalidade de um processo de esterilização com uma unidade de tempo (min), mas de acordo com a definição da *Parenteral Drug Association* (PDA, 2000), F_0 é o tempo de exposição em minutos equivalente à exposição a 121°C com valor de z de 10°C. Por exemplo, quando um ciclo de esterilização acumula valor de F_0 igual a 15 min, significa que o produto ficou exposto, teoricamente, 15 minutos a temperatura de 121°C. Isto significa que, de acordo com a equação (10), as exposições 115°C por 30 min e 134°C por 3 min (especificadas na Tabela 2 do item 1.1.1) são equivalentes, pois acumulam o mesmo valor de F_0 = 15 min.

$$Fo = \int_{t_1}^{t_2} 10^{\frac{T-121,1°C}{z}} dt \qquad (10)$$

Em que:

F_0 = letalidade acumulada a 121,1°C com o valor z de 10°C e valor D de 1 min.

t_1 = instante quando a menor temperatura for maior que 100°C.

t_2 = instante após t_1, quando a menor temperatura for menor que 100°C.

z = Número de graus de temperatura requerida para a mudança de 1 Log no valor D, no qual em processos de esterilização, este valor é 10°C.

T = temperatura instantânea em °C.

Conforme a figura 15, o cálculo da letalidade só apresenta algum valor significativo acima de 100°C. Por esta razão, o sistema de aquisição de dados realiza automaticamente o cálculo da letalidade somente quando as temperaturas estão acima deste valor.

$$Fo = \int_0^{1\min} 10^{\frac{100°C - 121{,}1°C}{10°C}} dt \Rightarrow 10^{-2{,}1} \Rightarrow 0{,}008\min \qquad (11)$$

Neste caso pode-se dizer que a esterilização a 100°C é 100 vezes menos eficaz que a 121°C, pois 1 minuto a 100°C equivale aproximadamente a 0,01 minutos a 121°C.

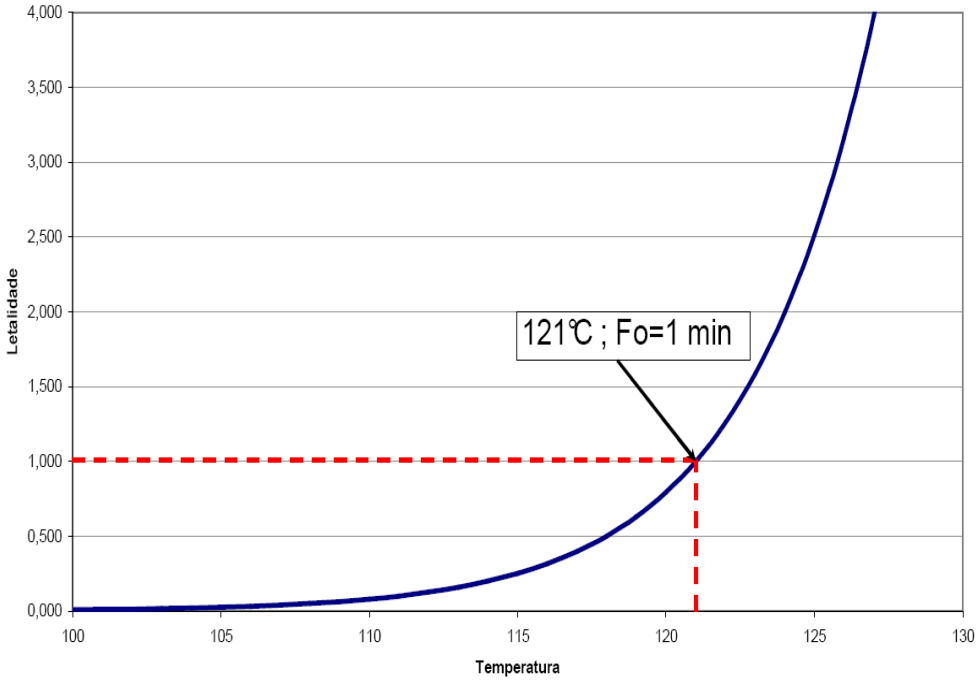

Figura 15 - Relação matemática entre letalidade e temperatura.

1.3.4. <u>*SAL (Sterile Assurance Level)*</u>

Ao contrário que muitos acreditam, a esterilização não significa simplesmente destruir todos os micro-organismos vivos. O conceito de esterilização absoluta está

sendo substituído pela probabilidade da carga estar estéril. Devido às limitações teóricas e práticas, nenhuma afirmação semelhante com respeito à ausência de micro-organismos pode ser provada. No processo de esterilização, a natureza da morte dos micro-organismos é descrita por uma função linear. Portanto, a presença de micro-organismos viáveis em qualquer item deve ser expressa em probabilidades (ISO 11139, 2006). Embora esta probabilidade possa ser reduzida a um número muito pequeno, nunca pode ser reduzida a zero (ISO 11134, 2001). É por esta razão que o termo nível de garantia de esterilidade é usado nas indústrias farmacêuticas para estimar ou avaliar a eficácia do processo de esterilização. Ele é geralmente retratado através de sua abreviatura em inglês SAL (*Sterile Assurance Level*) e expressa a probabilidade de sobrevivência de micro-organismos viáveis.

O valor padronizado pela maioria das Farmacopéias Internacionais é SAL de 10^{-6}. De acordo com a figura 16, para um ciclo alcançar SAL de 10^{-6} deve ser capaz de reduzir 12 ciclos logaritmos de uma população inicial de 1.000.000. Isto equivale a uma probabilidade de sobrevivência de 1 em 1.000.000 (FDA, 1994). O cálculo de probabilidade é extraído da seguinte equação.

$$F_0 = D_{121°C}(\log_{10} N_0 - \log_{10} B) \qquad (12)$$

Em que:

F_0 = Letalidade mínima requerida

$D_{121°C}$ = Resistência térmica do indicador biológico

N_0 = População inicial do indicador biológico

B = Probabilidade de sobrevivência do indicador biológico

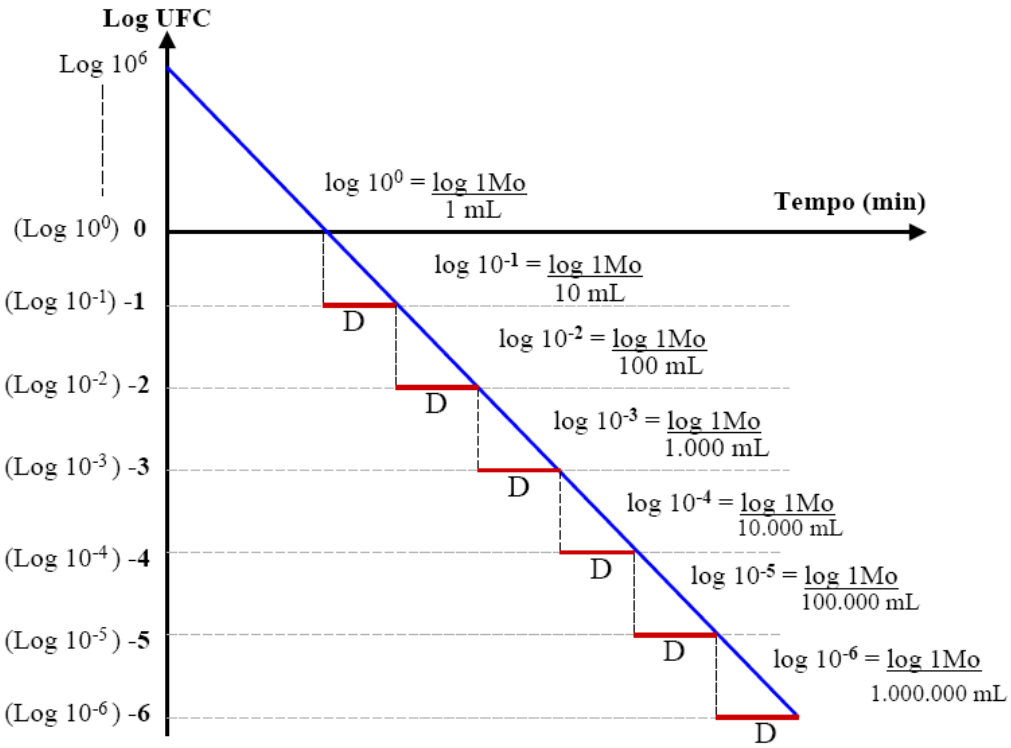

Figura 16 - Representação gráfica de SAL a 10^{-6} (Fonte: Penna, 2006).

Para estimar probabilidade de sobrevivência devemos rearranjar a equação para:

$$Log_{10}B = \log_{10} N_0 - \frac{F_0}{D_{121°C}} \tag{13}$$

Para exemplificar, num determinado desafio microbiológico, foi utilizado um indicador biológico de valor $D_{121°C}$ = 1,3 min com população inicial de 1,5 x 10^6. Para se obter um ciclo de esterilização que seja capaz de fornecer um SAL de 10^{-6} deve dimensionar um ciclo que seja capaz de acumular a seguinte a letalidade mínima:

$$\begin{aligned} F_0 &= D_{121°C}(\log_{10} N_0 - \log_{10} B) \\ F_0 &= 1{,}3(\log_{10} 1{,}5x10^6 - \log_{10} 10^{-6}) \\ F_0 &= 1{,}3(6{,}18 - (-6)) \\ F_0 &= 15{,}8\,\text{min} \end{aligned} \tag{14}$$

Agora exemplificando de maneira inversa, para estimar a probabilidade de um determinado ciclo de esterilização que acumulou uma letalidade mínima de 25,3 min e que foi desafiado com o mesmo indicador biológico:

$$
\begin{aligned}
&Log_{10}B = \log_{10} N_0 - \frac{F_0}{D_{121°C}} \\
&Log_{10}B = \log_{10} 1{,}5x10^6 - \frac{25{,}3}{1{,}3} \\
&Log_{10}B = 6{,}18 - 19{,}46 \\
&Log_{10}B = -13{,}28 \\
&B = 1x10^{-13{,}28}
\end{aligned}
\tag{15}
$$

Com isto conclui-se que o indicador biológico sofreu 13 reduções logarítmicas em relação à população inicial de 1,5 x 10^6 e que atingiu a probabilidade de sobrevivência de 1 x $10^{-13,28}$, após o término da esterilização.

1.4. Modelos de Esterilização do Vapor

De acordo com a Farmacopéia Americana (USP, 2009) “Modelo de Esterilização” são vários métodos de abordagens disponíveis para desenvolver um ciclo de esterilização por calor úmido, levando em conta a termoestabilidade da carga, o nível de garantia de esterilidade desejado e o custo de esterilização. Embora cada um desses modelos tenha potencial de atingir qualquer valor de SAL desejado, cada um utiliza diferentes quantidades de transferência de calor à carga, custo de esterilização, custo de manutenção do processo e risco de negócios com relação ao fator de segurança. De acordo com a *Parenteral Drug Association* (PDA, 2000), existem três modelos básicos: ‘sobremorte’ (*overkill*), ‘indicador biológico combinado com carga microbiana’ (*Bioburden / Bioindicator Combination*) e ‘carga microbiana total’ (*absolute bioborden*).

Cada um dos métodos tem exigências diferentes com relação às cargas, aos desafios microbiológicos e ao monitoramento ambiental (acompanhamento microbiológico contínuo para monitorar o processo). De acordo com a figura 17, o modelo carga microbiana total oferece menor exposição térmica da carga, o que reduz o risco de dano ao produto, porém demanda mais custo para manter uma equipe de monitoramento ambiental, para verificar se o processo está atendendo as especificações. O modelo combinado requer uma exposição térmica moderada com risco moderado a integridade física da carga e um menor acompanhamento

microbiológico. O método que requer menos dados microbiológicos, mas requer mais energia e, conseqüentemente, mais risco de danos à carga é o sobremorte.

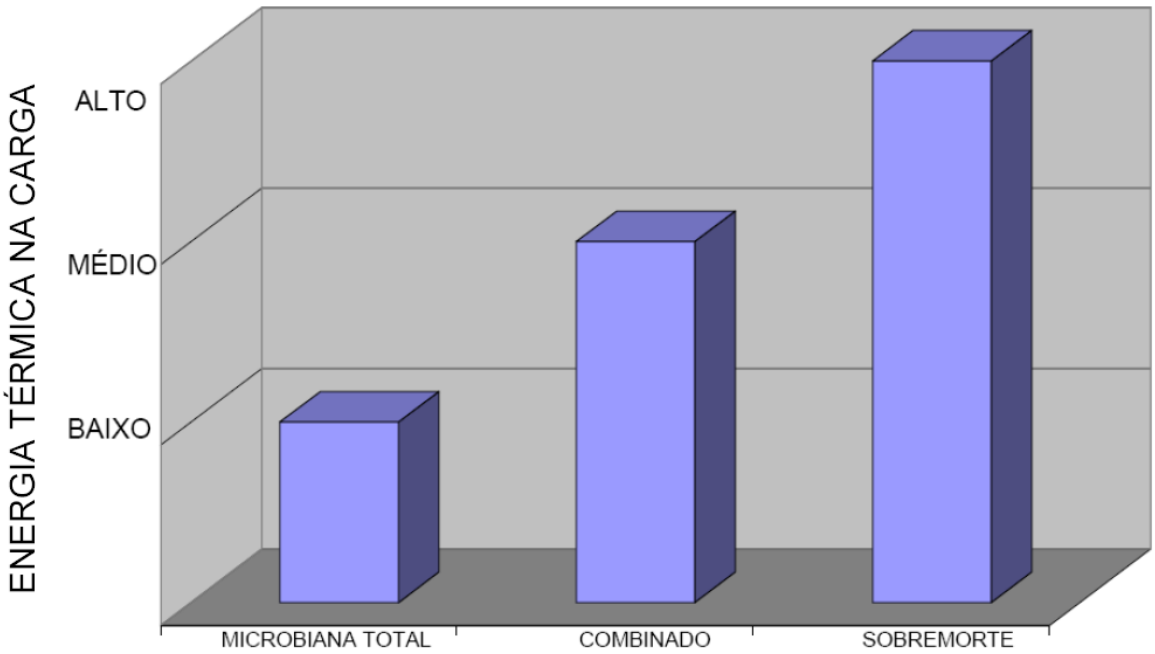

Figura 17 - Método de esterilização versus energia térmica na carga (Fonte: PDA, 2002).

Os modelos sobremorte e combinado utilizam indicadores biológicos. Em ambos, o risco de contaminação após a esterilização é muito baixo, uma vez que existe uma margem de segurança substancial nos indicadores biológicos utilizados. Ao contrário do método carga microbiana total, que não oferece margem de segurança, capaz de esterilizar um possível micro-organismo com uma resistência térmica ligeiramente superior. Estas relações estão representadas no gráfico da figura 18. A decisão final de qual modelo a utilizar para o desenvolvimento de um ciclo, baseia-se na termoestabilidade da carga, nas exigências dos órgãos regulatórios e nos custos para manter o processo.

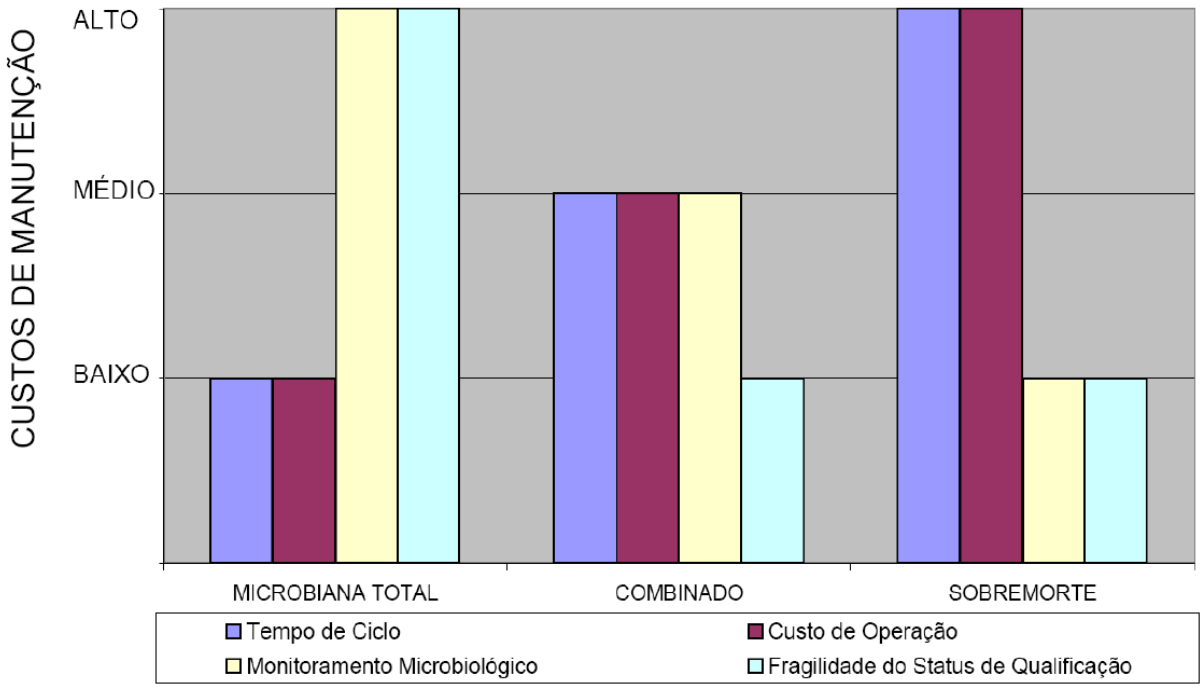

Figura 18 - Método de esterilização versus custo de manutenção (Fonte: PDA, 2002).

1.4.1. Método de Sobremorte (*Overkill*)

O método de sobremorte geralmente é utilizado para esterilizar componentes de máquinas, equipamentos e alguns produtos acabados. Este método apresenta boa aceitação entre os órgãos regulatórios e muitas empresas os escolhem, pois a expectativa de sobrevivência dos indicadores biológicos durante a validação dos ciclos de esterilização é praticamente nula. Para muitos, o não crescimento microbiano é a única maneira de demonstrar que o ciclo é eficaz.

Este método requer que a carga seja termoestável (resistente ao calor). O critério de aceitação, utilizado pela maioria dos órgãos regulatórios, é que a probabilidade de sobrevivência de micro-organismos esteja na ordem de 10^{-6} (FDA, 1994). O objetivo deste método é garantir que o SAL seja atingido, independente do numero de população e da resistência térmica dos micro-organismos presentes na validação. De acordo com a figura 19, o método sobremorte é executado, dimensionando um ciclo que forneça calor suficiente para alcançar 12 reduções logarítmicas em relação ao indicador biológico. O desafio microbiológico deve conter indicadores com população superior a 10^6 e com valor $D_{121°C}$ superior a 1 min/log.

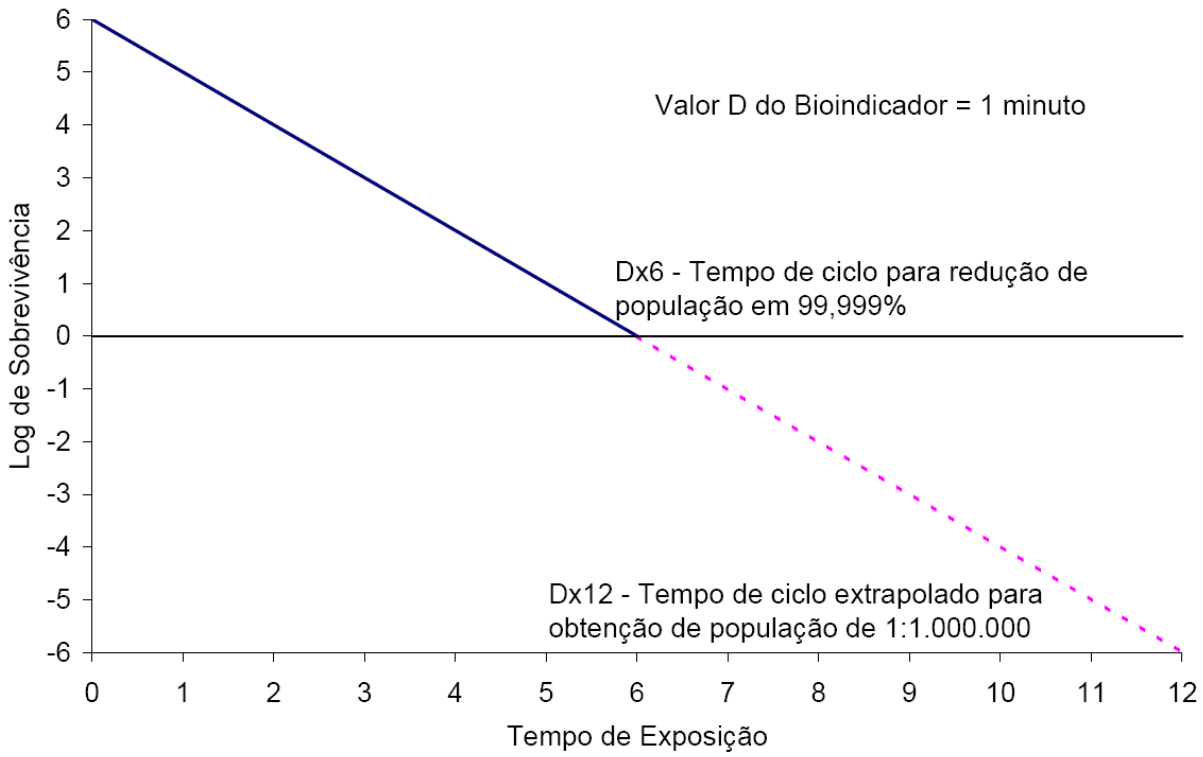

Figura 19 - Representação gráfica do método sobremorte (Fonte: PDA, 2002).

Uma outra maneira de realizar um método sobremorte é dimensionar, durante a validação, um ciclo que seja capaz de matar todos os micro-organismos do desafio microbiológico (redução de 6 log). Depois, na rotina, utilizar um ciclo que tenha o dobro do tempo de exposição que matou todos no desafio microbiológico (redução de 12 log). Isto é chamado de estudo de qualificação de meio-ciclo.

Uma vez que os indicadores biológicos são mais resistentes que os micro-organismos encontrados no ambiente de produção, presume-se que os dados coletados na validação possam ser replicados para os micro-organismos encontrados no ambiente de produção. No entanto, desde 1994 a FDA vem pedindo dados de resistências térmicas dos micro-organismos encontrados no ambiente de produção (FDA 1994).

O método *sobremorte* fornece mais calor à carga e, conseqüentemente, traz alto risco à termoestabilidade do produto. Ele tem maior tempo de exposição, ocasionando alto impacto econômico ao custo de operação da autoclave, mas, em compensação, tem menos custo com monitoramento ambiental continuo.

1.4.2. Método Combinado Indicador biológico / Carga Microbiana (*Bioburden / Bioindicator Combination*)

Este método consiste em utilizar informações sobre a relação entre os indicadores biológicos e a resistência térmica da carga microbiana isolada. Isso permite estimar a letalidade necessária do indicador biológico para atingir um SAL de 10^{-6}, com base na relação da resistência térmica entre o indicador biológico e a carga microbiana isolada.

Geralmente é usado em cargas que não são resistentes ao calor, como por exemplo, soluções de meio de cultura, estabilizadores e medicamentos finais. O ciclo de esterilização deve ser desenvolvido para que seja capaz de alcançar a letalidade mínima requerida, sem que haja degradação da carga.

O desenvolvimento do ciclo depende de estudos microbiológicos para determinar o número de bactérias normalmente presentes no produto e a resistência térmica destes micro-organismos (tempo de redução decimal ou valor D). Geralmente apenas as bactérias formadoras de esporos, que são resistentes ao calor, são isoladas e submetidas à determinação do valor D. Uma vez que a quantidade e a resistência do micro-organismo isolado são conhecidas, o ciclo pode ser dimensionado para fornecer uma relação entre a curva de morte do micro-organismo isolado e a curva de morte do indicador biológico. Normalmente requer um SAL de 10^{-6} para carga microbiana isolada, permitindo a sobrevivência de alguns do indicador biológico. Por exemplo, na figura 20, o indicador biológico utilizado tem valor D de 1 minuto e a carga microbiana isolada tem valor D de 0,5 minuto. Então, para cada log reduzido do indicador biológico, 2 log serão reduzidos da carga microbiana isolada. Para demonstrar que a carga microbiana isolada alcançou 12 reduções logarítmicas, basta certificar que o indicador biológico sofreu uma redução de 6 log.

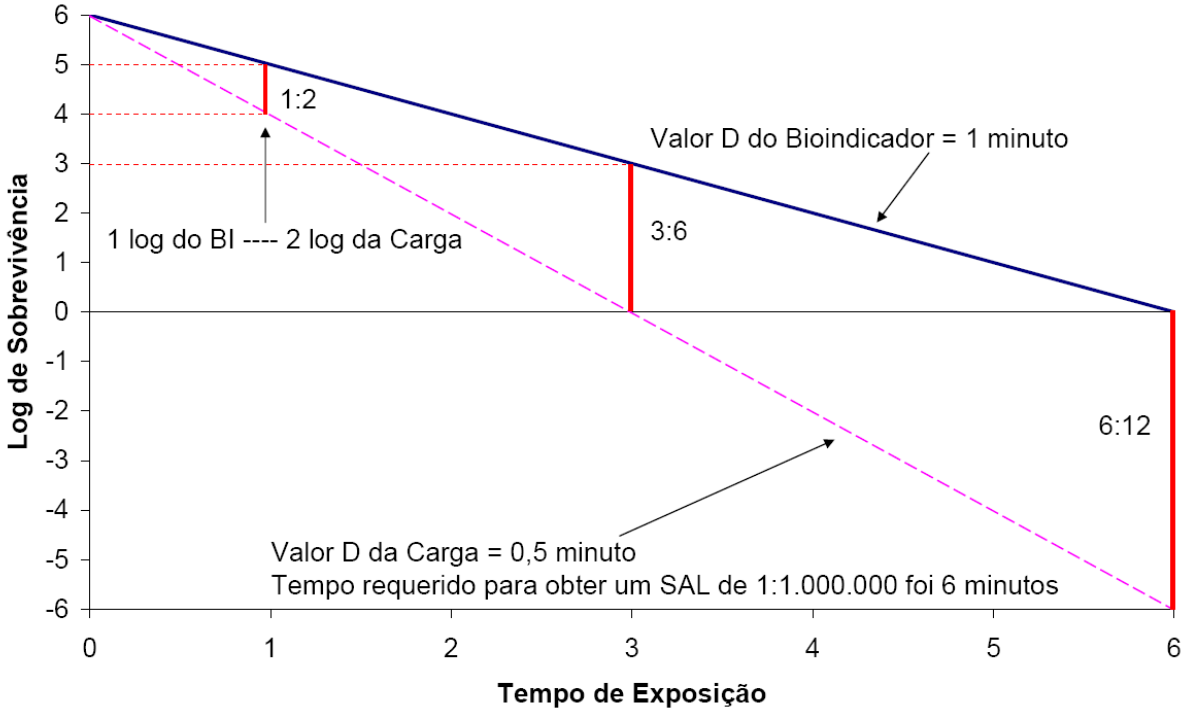

Figura 20 - Representação gráfica do método combinado (Fonte: PDA, 2002).

Este método combinado é mais utilizado para cargas que não suportam o método *sobremorte*. Este método fornece menos calor à carga, diminuindo o impacto à degradação da carga e tem um tempo de ciclo menor, gastando menos energia. No entanto, requer exames periódicos para garantir que a relação micro-organismo isolado / indicador biológico continuam as mesma.

1.4.3. Método de Carga Microbiana Total (*Absolute Bioburden*)

Os métodos de carga microbiana total são ciclos de esterilização cujo desenvolvimento baseia-se somente na resistência térmica da carga microbiana predominante nas indústrias. Nenhum indicador biológico é utilizado, mas o micro-organismo isolado mais resistente é cultivado e coletado para ser utilizado no desafio microbiológico. Este método requer estudos de monitoramento ambiental para determinar o tipo e número de micro-organismos presentes nas instalações. Ele não é amplamente utilizado, pois requer muito custo para manter o monitoramento ambiental. Alem disso, os demais métodos oferecem um SAL semelhante, porém sem a necessidade de elaborar e manter um complexo desafio microbiológico. Geralmente os micro-organismos isolados não conseguem ser mantidos para uso em longo prazo. De acordo com a figura 21, o tempo necessário para alcançar um

SAL de 10^{-6} foi estimado através do tempo gasto para reduzir a população até zero. Se foram gastos 1,5 minutos para reduzir 3 log, conclui-se que serão necessários mais 3 minutos para alcançar a probabilidade de sobrevivência de 1: 1.000.000.

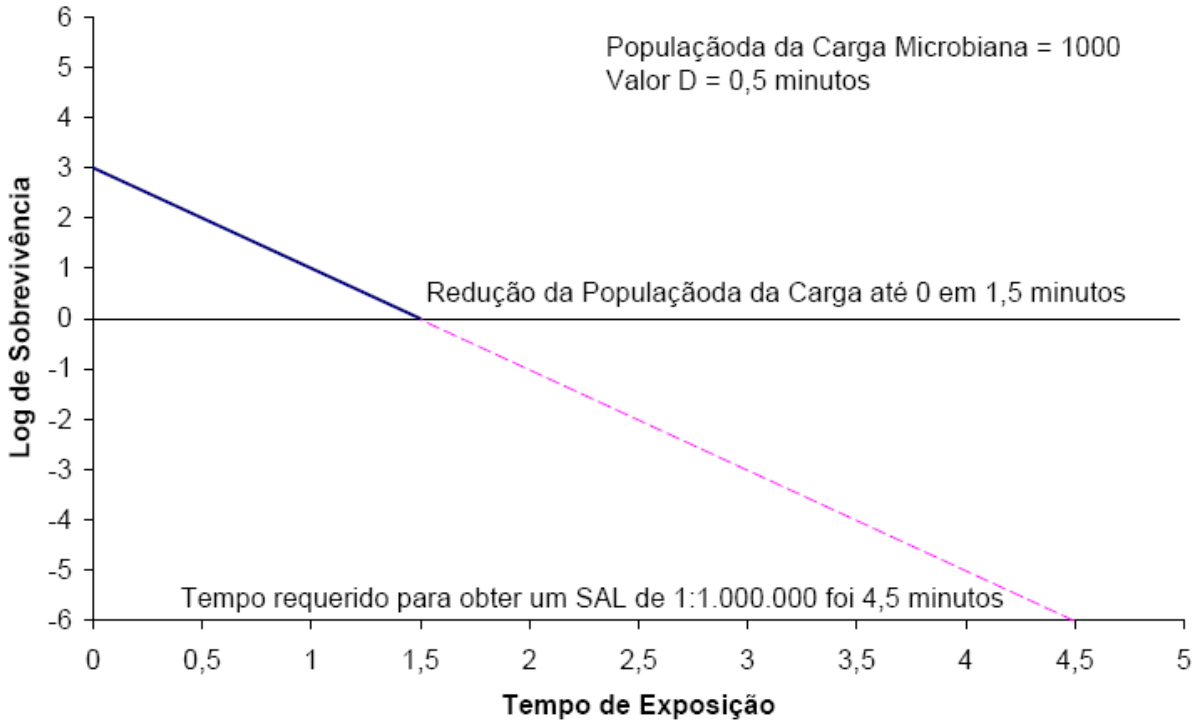

Figura 21 - Representação gráfica do método carga microbiana total (Fonte: PDA, 2002).

Nenhum método é melhor ou pior que outro. Todos apresentam certos benefícios e riscos e são todos capazes de fornecer um SAL aceitável. Cabe a cada empresa farmacêutica avaliar os diversos riscos e benefícios e escolher o melhor método que atenda os requisitos dos órgãos regulatórios e as estratégias de negócios.

1.5. Requisito de Normas e Órgãos Regulatórios

Nas indústrias farmacêuticas existem vários regulamentos e normas sobre esterilização a vapor e, infelizmente, não há muita semelhança entre eles. Este problema se agrava quando a indústria exporta os seus produtos para diferentes países, pois em cada lugar as agencias regulatórias tem suas particularidades. A fim de minimizar estas divergências, os órgãos regulatórios internacionais começaram a promover encontros para expressar suas opiniões e harmonizar as particularidades. Acreditava-se que estes encontros criariam procedimentos, regras e diretrizes de

“como fazer”, mas na prática foram apenas encontros de grupos que discutiam sobre o assunto e concordavam ou discordavam de acordo com seus interesses.

Muitos fabricantes de produtos farmacêuticos realizam transações internacionais e as tentativas para satisfazer as exigências internacionais para esterilização geram grande frustração. Embora existam algumas normas ISO (*International Organization for Standardization*) para a esterilização a vapor, elas não refletem as necessidades de todas as agências reguladoras. Isso obriga as empresas a tomar decisões difíceis sobre os processos de esterilização, como por exemplo, criação de ciclos padrão de esterilização altamente rigorosos que tentam atender todas as normas e exigências regulatórias (tanto do mercado interno como no mercado externo). Essas decisões certamente resultam em aumento do custo de fabricação do medicamento.

1.5.1. Documentos sobre Validação de Esterilização por Vapor

Em novembro de 1994, a *Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia sobre validação de processo de esterilização (FDA, 1994). Embora o documento FDA seja apenas um guia, ele se tornou na verdade um roteiro de regulamento utilizado durante as inspeções.

Na mesma época, em 1994, o equivalente britânico do FDA, *Medicines Control Agency* (MCA), publicou um documento relativo à esterilização e a validação de esterilização (HTM 2010) que introduziu um novo conjunto de requisitos para a qualificação de autoclaves e testes de qualidade de vapor (HTM 2010, 1994).

Em janeiro de 1997, *a World Health Organization (WHO)* publicou o guia *A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements part 2: Validation* demonstrando um exemplo de qualificação de autoclave (OMS, 1997). Este guia sugere um grande número de estudos térmicos, tornando-se praticamente inviável para um complexo industrial com várias autoclaves e cargas.

Em outubro de 1997 a ANVISA publicou a Portaria nº. 500/MS/SNVS ANEXO I - Validação do Processo de Esterilização pelo Valor - que estabelece as condições exigidas para validar um ciclo de esterilização por calor úmido, de modo a garantir a eficiência do processo (ANVISA, 1997).

Em novembro de 2002, na Europa, a *European Union Good Manufacturing Practice* (*EU GMP*) liberou para consulta pública o guia *Manufacture of Sterile*

Medicinal Products que foi oficialmente publicado em Setembro de 2003 (*EU GMP, 2002*).

Analisando estes documentos, percebem-se divergências nos requisitos. Além disso, existem varias normas ISOs e farmacopéias de várias nações, inclusive a brasileira, que fornecem informações distintas sobre a esterilização e a utilização de indicadores biológicos no processo de esterilização.

A situação ideal para as indústrias farmacêuticas seria a existência de normas de esterilização baseados em conceitos científicos, que fossem aceitas em todos os paises, mas infelizmente, esta não é a realidade, pois muitos documentos de regulamentação contêm informações ultrapassadas e exigências com pouca ou nenhuma base na ciência de esterilização. Agalloco, Akers e Madsen (2009) resumiram e explicaram as várias inverdades associados à esterilização a vapor: é difícil confrontar as inspeções com base na ciência de esterilização por vapor, quando existem vários regulamentos com exigências conflitantes; é ainda mais difícil e frustrante lidar com as diferentes interpretações de diferentes auditores (nem sempre para a próxima inspeção é mantido o último inspetor), que muitas vezes se baseiam em normas e não na ciência.

1.5.2. Dificuldade para Harmonização

O problema mais difícil para conciliar as diferentes exigências internacionais para esterilização a vapor é que os documentos existentes não usam os mesmo conceitos de esterilização. Como já foi dito anteriormente, um dos métodos para configurar um ciclo de esterilização é o método sobremorte. A Farmacopéia Européia e o EMEA definem que um ciclo de sobremorte é aquele que seja capaz de fornecer tempo de exposição de 121°C por 15 minutos, contanto que a contagem de tempo comece quando todos os pontos da carga atinjam 121°C (EDQM, 2005). Esta definição não requer conhecimento de Valor D para os indicadores biológicos utilizados na validação. A Farmacopéia Americana, por outro lado, define que um ciclo de sobremorte é aquele que seja capaz de reduzir 12 log de uma carga microbiana de Valor $D_{121°C}$ de no mínimo 1 minuto, ou seja, F_0 igual a 12 minutos (USP, 2009). Visto que definições para um simples método sobremorte são diferentes, conclui-se que seja bastante improvável que os órgãos regulatórios internacionais cheguem a um consenso comum, em curto espaço de tempo.

1.5.3. Situação no Brasil

No Brasil, por serem mais detalhados, geralmente são adotados os regulamentos americanos da FDA, mas existem varias normas nacionais que estão listadas na Tabela 3. Na prática, os critérios adotados são:

- Não devem apresentar variações de temperatura superior a 2°C acima ou abaixo da média das temperaturas de todos os sensores, durante o período em que as cargas permaneçam à temperatura de exposição.
- Os sensores de temperatura devem ser calibrados antes e depois de cada estudo e os resultados das calibrações não devem apresentar variações de temperatura de ± 0,5°C com respeito ao termômetro de referência.
- A diferença de temperatura entre o sensor do registrador de temperatura da autoclave e do sensor em estudo não deve variar mais de 1,0°C.
- Deve haver pelo menos 9 (nove) sensores funcionando corretamente durante o estudo.
- A letalidade requerida deve ser alcançada até o final do ciclo.

Tabela 3 - Normas nacionais

Número	**Ano**	**Edição**	**Título**
NBR 11816	2003	ABNT	Esterilizadores a vapor com vácuo, para produtos de saúde.
NBR 11817	2001	ABNT	Esterilização - Esterilização a vapor - Esterilizadores pequenos - Requisitos.
NBR-18861	1997	ABNT	Instrumentais cirúrgicos e odontológicos – Resistência à esterilização em autoclaves – Requisitos gerais.
NBR-12946	1993	ABNT	Papel grau cirúrgico para embalagem de produtos odonto-médico-hospitalares – Requisitos.
NBR-13849	1997	ABNT	Esterilizadores a gás de óxido de etileno puro e suas misturas – Requisitos.
NBR-8166	1995	ABNT	Estufa Esterilizadora a Gravidade – Requisitos.
NBR-11134	2001	ABNT	Esterilização de produtos hospitalares – Requisitos para validação e controle de rotina – Esterilização por calor úmido.
NBR-13851	1997	ABNT	Instrumentais cirúrgicos e odontológicos – Resistência à esterilização em autoclave, à corrosão e à exposição – Técnica – Requisitos gerais.
NBR-14332	1999	ABNT	Instrumentais cirúrgicos e odontológicos de aço inoxidável – Orientações sobre manuseio, limpeza e esterilização.
RDC 210	2003	ANVISA	Boas práticas para fabricação de medicamentos

Cabem aos membros da alta direção das indústrias farmacêuticas determinarem uma estratégia de validação de processo de esterilização que atenda todas as exigências regulatórias sem causar impacto nos custos financeiros.

1.6. Processo de Validação - Ciclo de Vida de Autoclave

A validação é aplicada em muitos setores na indústria farmacêutica, incluindo serviços, equipamento, sistemas, processos e limpeza. Em cada caso o objetivo é *produzir evidências documentadas, que forneçam um grau elevado de garantia de que todas as partes das instalações trabalham conforme o esperado quando trazidas em operação* (*FDA,* 1987).

A validação consiste em:

- **Qualificação de Instalação (QI):** Verificação documentada de que um sistema está instalado de acordo com especificações escritas e pré-aprovadas.
- **Qualificação de Operação (QO):** Verificação documentada de que um sistema opera de acordo com especificações escritas e pré-aprovadas durante todas as escalas de operação especificadas.
- **Qualificação de Performance (QP):** Verificação documentada de que um sistema é capaz de desempenhar ou controlar as atividades dos processos que são requeridas para executar ou controlar, de acordo com especificações escritas e pré-aprovadas, enquanto opera em seu ambiente de operação especificado.
- **Qualificação de Design (QD):** Este termo tem sido introduzido recentemente, referindo-se à verificação documentada de que o projeto proposto para as instalações dos sistemas e dos equipamentos é apropriado para a finalidade pretendida.

Os documentos de qualificação descritos acima contem não só especificações técnicas, mas também as instruções de teste. O termo Protocolo de Validação é usado frequentemente quando referidos a estes documentos.

Uma estrutura básica de validação, apresentada na figura 22, mostra como as três principais atividades de qualificação interagem com os três níveis básicos de

especificações, formando a letra “V” de validação. Juntos, os três níveis de especificações definem o desenvolvimento da autoclave.

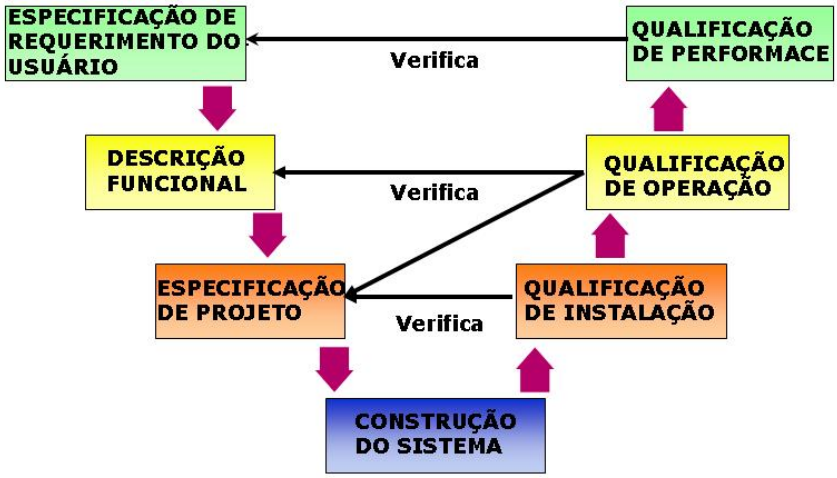

Figura 22 - Estrutura básica para especificação e qualificação (Fonte: ISPE, 2008).

O relacionamento entre as fases de especificação e a qualificação é complexo. As verificações de que as exigências regulatórias e os objetivos do projeto ocorram conforme o esperado deve ocorrer exaustivamente e minuciosamente na fase de especificação. Ao contrário do que muitos acreditam, a validação se inicia com a idéia do projeto e termina com a retirada da autoclave. Esta verificação é essencial para que a autoclave seja entregue no tempo estimado e dentro do orçamento pré-estabelecido.

1.6.1. Revalidação

A revalidação é repetição de parte ou de todos os testes de validação com a intenção de reconfirmar a confiabilidade do processo (ANVISA, 2004). Infelizmente os órgãos regulatórios não regulamentam quais partes dos testes devem ser repetidas, dando margem para cada inspetor propor recomendações distintas, toda vez que a fábrica é inspecionada.

Ela deve ser feita toda vez que um reparo significativo na autoclave possa afetar a eficácia do processo. A revalidação também deve ser realizada no mínimo uma vez a cada ano (ISO11134, 2001).

Na prática, as indústrias que têm poucas autoclaves com poucos ciclos realizam anualmente estudo de validação térmica com desafio microbiológico em

todas as configurações de carga. Já as indústrias que apresentam grande número de autoclaves e ciclos, estabelecem estudos anuais dos “piores casos”. Cada estratégia é bem aceita pelos órgãos regulatórios se ela for bem documentada e fundamentada com conceitos microbiológicos e termodinâmicos.

1.7. Ferramentas Estatísticas

A validação é regida por números e, muitas vezes, a imensidão de dados disponíveis não é usada como deveria. Segundo Vieira (2009), um bom estatístico é aquele que sabe conjugar, projetar e interpretar todos os dados já disponíveis para retirar conclusões reveladoras. Já Sicsú (2009), do Departamento de Estatística da Fundação Getulio Vargas (FGV), disse que “A estatística é a arte de torturar os números até que eles confessem. Eles sempre confessam”.

1.7.1. Controle Estatístico de Processo – CEP

Controle Estatístico de Processo (CEP) é um conjunto de ferramentas usadas para resolver problemas, com o objetivo de encontrar a estabilidade do processo e melhorar a capacidade através da redução da variabilidade. A finalidade do CEP é monitorar os resultados de muitas amostras ao longo de um período de tempo e através de gráficos de controle verificar se o processo está desempenhando como deveria ou, alternativamente, se está saindo de controle. Se o processo está, de fato, saindo de controle, providências poderão ser tomadas antes que haja um problema. O CEP pode ser aplicado a qualquer processo.

1.7.1.1. Carta de Controle

As mais importantes e também as mais conhecidas ferramentas do CEP são as Cartas de Controle. Elas são úteis em determinar se um processo está se comportando como desejado ou se existem algumas causas não aleatórias de variação interagindo no processo. Um processo é considerado fora de controle quando um ponto situa-se fora dos limites de controle ou uma série de pontos exibe um comportamento não natural (não aleatório).

Procurar tendências é um uso importante dos gráficos de controle. Se a tendência sugere que o processo está ficando constantemente pior, então vale a pena investigar o processo. Se a tendência está constantemente melhorando, ainda pode valer a pena investigar o que está fazendo o processo melhorar. Essas informações podem, então, ser compartilhadas com outras partes da organização ou, por outro lado, o processo pode ser interrompido, já que a causa poderia estar acrescendo desnecessariamente despesas à operação (Balestrassi, 2000).

Os gráficos de controle contêm uma linha central (LM) que representa o valor médio da medida e duas linhas horizontais chamadas de limite superior de controle (LSC) e limite inferior de controle (LIC). Se processo está sob controle, praticamente todas as amostras estarão entre LSC e LIC. Isto pode ser observado na figura 23.

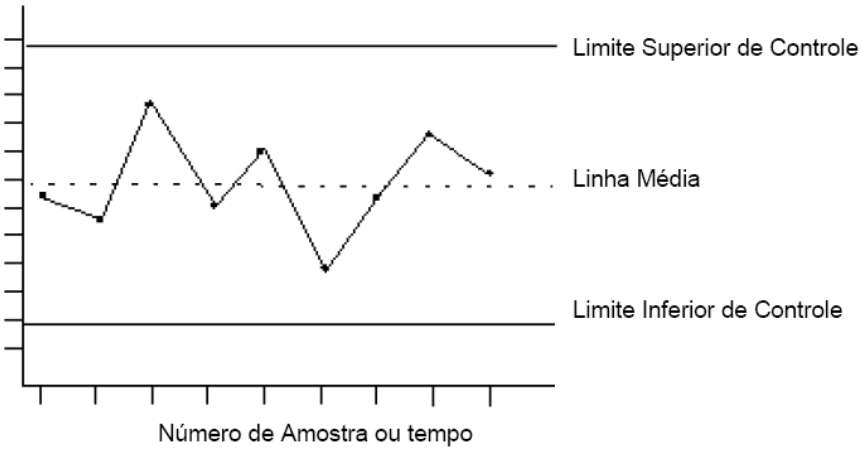

Figura 23 - Gráfico de Controle

Os limites de controle indicam a extensão esperada da variação de causas comuns. Se alguns pontos caem fora desses limites de controle, então o processo pode ser considerado fora de controle, pois a variação é provavelmente devida a causas especiais.

$$\begin{aligned} LSC &= \mu + L\sigma \\ LM &= \mu \\ LIC &= \mu - L\sigma \end{aligned} \tag{16}$$

Onde L é distância dos limites de controle à linha média expressa em unidade de desvio padrão, μ é a média do processo e σ é o desvio padrão do processo.

A escolha dos limites de controle é uma das decisões relevantes que devem ser tomadas. Grandes valores de LSC e LIC diminuem o risco de um erro tipo I (reprovar um ponto que era para ser aprovado), mas em compensação aumentam o risco do erro tipo II (aprovar um ponto que era para ser reprovado). Pequenos

Valores de LSC e LIC acarretam efeitos opostos: aumento do risco tipo I, enquanto o tipo II é diminuído. Na maioria dos processos industriais os limites são expressos em 3σ. A fim de tomar uma ação corretiva, enquanto o sistema ainda está sob controle, algumas indústrias utilizam 2σ como limite de alerta (figura 24).

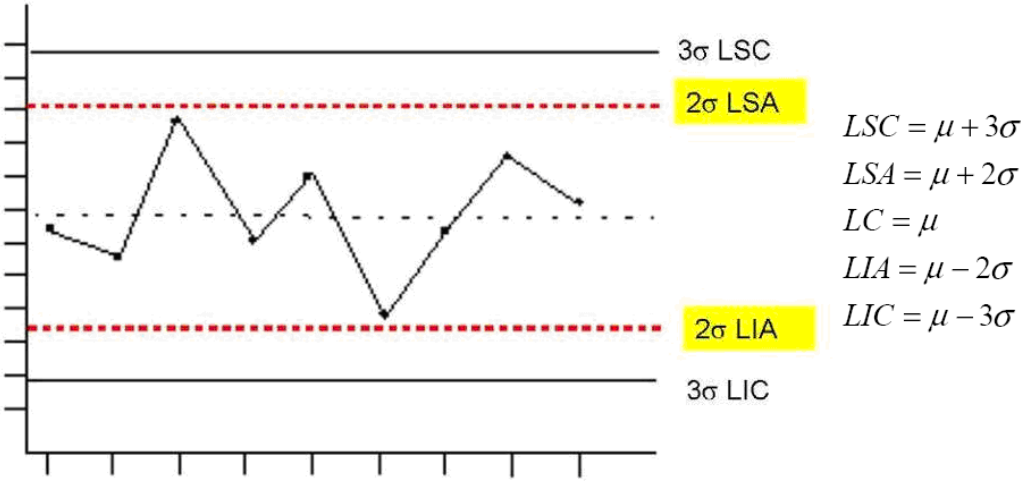

Figura 24 - Limite de Alerta

1.7.1.2. Capacidade do Processo

Quando a maioria das medições está dentro do limite de controle, diz-se que o processo está sob controle estatístico, porém mesmo um processo sob controle estatístico produz itens defeituosos. Logo, não basta colocar e manter um processo sob controle, também é fundamental avaliar se o processo é capaz de atender às especificações estabelecidas a partir das necessidades do processo. É esta avaliação que constitui a análise da capacidade do processo, que é medida através da relação entre a variabilidade natural do processo em relação à variabilidade que é permitida a esse processo, dada pelos limites de especificação.

Dentre os métodos difundidos de avaliação, o mais usual é o que propicia o cálculo dos índices de capacidade Cp, para processo centralizado, e Cpk, para processo descentralizado, quando a média do processo é diferente da média da especificação. Para um processo representado por uma distribuição normal é comum utilizar uma dispersão 6σ de referência.

O Cp foi o primeiro dentre os cinco índices de capacidade do processo desenvolvidos pelos japoneses. Projetado para dar uma medida indireta da habilidade do potencial do processo em satisfazer as exigências (especificações), sua definição é da forma:

$$Cp = \frac{LSE - LIE}{6\sigma} \tag{17}$$

Segundo Alonso (2005), para o processo ser considerado capaz, o índice Cp deve ser igual ou maior do que 1, o que equivale a dizer que pelo menos 99,73% dos valores medidos estão conformes, admitindo-se a distribuição normal para a variabilidade das unidades produzidas e que a média do processo seja centralizada na especificação. Entretanto, Cp = 1 não é comumente usado como um valor mínimo aceitável. Uma estimativa de Cp = 1,33 se tornou o critério mais comumente aceito como limite inferior para determinação da capacidade de um processo. Essa estimativa assegura que os dados do processo utilizam aproximadamente 75% ou menos da amplitude de especificação. Isso assegura uma taxa muito baixa de rejeição (0,007%) e é, portanto uma estratégia efetiva para análise dos resultados. Montgomery (2004) descreve valores mínimos de 1,33 para especificações bilaterais e 1,25 para especificações unilaterais em um processo existente. Para processos novos cita valores mínimos de 1,50 para especificações bilaterais e 1,45 para especificações unilaterais.

Como na prática nem sempre o processo está centrado no valor nominal da especificação, então, o uso do índice Cp pode levar a conclusões erradas, Kane (1986) propôs índice de desempenho Cpk, que leva em consideração a distância da média do processo em relação aos limites de especificação. Este índice esta ilustrado na figura 25 e é dado pela seguinte equação:

$$Cpk = \min\left(\frac{LSE - \mu}{3\sigma}, \frac{\mu - LIE}{3\sigma}\right) \tag{18}$$

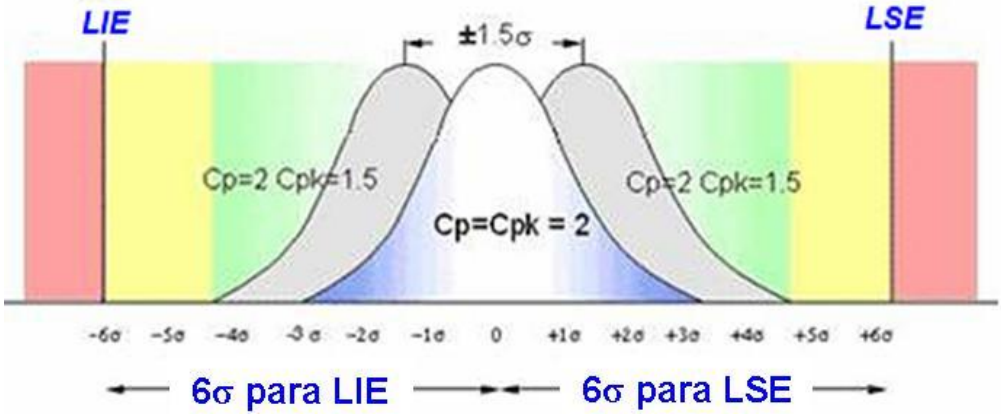

Figura 25 - Relação Gráfica entre Cp e Cpk

1.7.2. Planejamento Experimental – DOE

Segundo Montgomery (2004), a aplicação da metodologia do planejamento experimental (também conhecido pela sua abreviatura em inglês DOE- *Design of experiments*) na fase de desenvolvimento é fundamental para melhoria do produto e otimização do processo de fabricação. Este princípio tem sido utilizado em diferentes indústrias, inclusive nas farmacêuticas. O uso correto da metodologia DOE pode levar a processos de fabricação mais simples e com maior confiabilidade.

Na prática, o DOE é uma serie de testes, onde são feitas mudanças propositais nas variáveis de entrada de um processo para observar os impactos na resposta de saída, levando em consideração os possíveis ruídos existentes no sistema (figura 26).

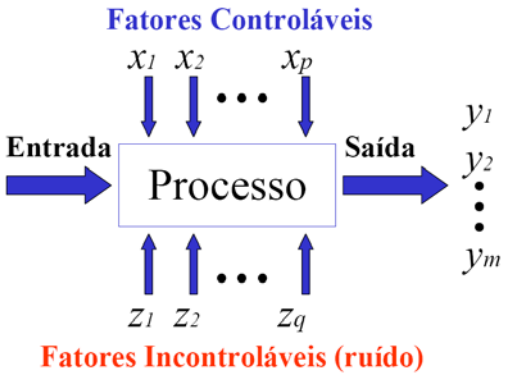

Figura 26 - Modelo de um Processo

O CEP junto com DOE, se bem interpretados, formam poderosas ferramentas estatísticas para a melhoria e otimização do processo. Um processo pode estar sob controle, mas ainda não atender aos requisitos de projeto, ou seja, capacidade de processo inferior. Segundo Montgomery (2004), o CEP é um método estatístico passivo, onde as informações são apenas observadas para depois tomar uma ação corretiva. Já o DOE é um método estatístico ativo, onde vários testes são realizados, fazendo mudanças na entrada e analisando as mudanças correspondentes na saída.

1.7.2.1. Planejamento Fatorial

Quando há vários fatores de interesse em um experimento, é utilizado um planejamento fatorial. Este é muito útil para controlar as variáveis do processo e determinar quais são as mais relevantes. O planejamento fatorial mais utilizado é o

planejamento 2^k onde k é o número de fatores, cada um com dois níveis. O tipo mais simples é 2^2 (dois fatores com dois níveis), onde os fatores são representados pela letra A e B e os níveis são representados pelos símbolos “+” e “-”. O modelo 2^2 é facilmente representado na figura 27, onde o numero de combinações (2^2=4) é representado pelos vértices do quadrado. Os efeitos de interesse neste tipo de planejamento são os efeitos principais A e B e a interação AB.

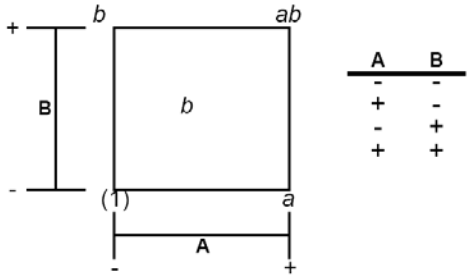

Figura 27 - Geometria do planejamento e matriz de teste de 2^2.

O planejamento 2^k pode ser estendido para mais de dois fatores, como por exemplo, k=3. Neste o planejamento é representado na figura 28 por um cubo, onde contém três fatores, dois níveis e oito combinações (2^3=8). Os efeitos de interesse neste tipo de planejamento são os três efeitos principais A, B e C; as três interações de dois fatores AB, AC e BC e uma interação de três fatores ABC.

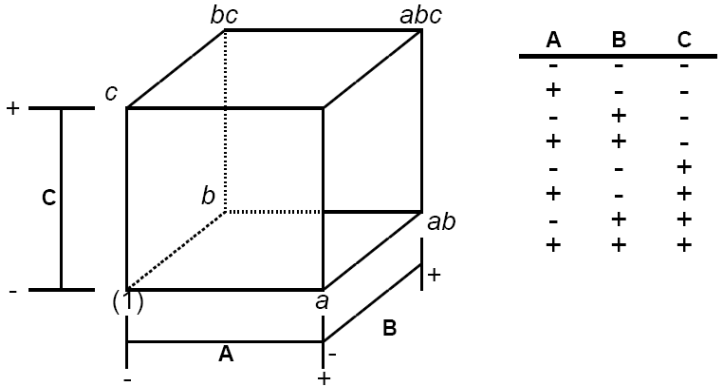

Figura 28 - Geometria do planejamento e matriz de teste de 2^3.

1.7.2.3. Modelo de Regressão

Para resumir os resultados do experimento é utilizado um modelo de regressão. Por exemplo, experimentos com k=2 são expressos, depois de ajustados, pela seguinte equação:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \qquad (19)$$

Em que:

y é a variável de resposta

x são os regressores

β são os coeficientes de regressão

ε é o termo erro aleatório

Os coeficientes de regressão são escolhidos de modo a minimizar a soma dos quadrados dos erros ε (método dos mínimos quadrados).

É fundamental expressar os resultados do planejamento experimental através de um modelo de regressão, pois será muito importante na interpretação do estudo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

2.1.1. Autoclave

O equipamento utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi uma autoclave da marca STERIS FINNAQUA, modelo 6912-E-C, mostrada na figura 29, construída em aço inox do tipo 316L, com câmara interna de aproximadamente 686 L (900 x 610 x 1250 mm).

Figura 29 - Autoclave STERIS FINNAQUA

2.1.1.1. Sistema de Controle

O sistema de controle consiste de um controlador lógico programável (CLP) SLC 500 Alen-Bradley e uma interface de operação PainelView 900 Allen-Bradley. Sistema de controle, impressora, transformadores, fusíveis, etc., são montados em um gabinete de controle (figura 30).

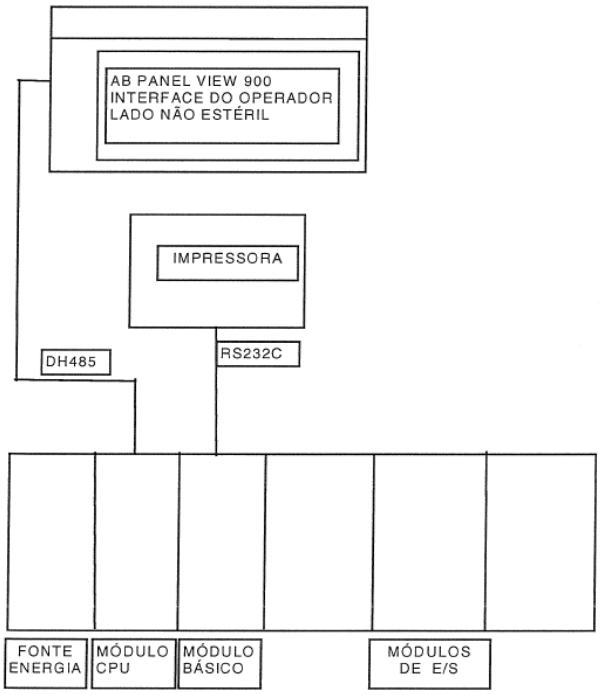

Figura 30 - Diagrama de blocos típico de sistema de controle

2.1.1.2. Medição de Temperatura

O elemento de medição usado no sensor de temperatura é um detector de temperatura por resistência (DTR) de platina (Pt), de 100 Ω, de acordo com os padrões IEC 751 Classe A. A precisão do sensor não calibrado a 121 °C é de ±0,3°C com uma repetibilidade de mais de 0,05% da medição. A precisão do sensor calibrado a 121 °C é de ±0,15°C. O tamanho da sonda é 100 mm de comprimento, 6 mm de diâmetro e o comprimento do fio é de 5 m. O cabo da sonda é feito de núcleo de cobre estanhado microtexturizado com isolamento de Teflon® e cobertura externa de silicone. Existe um sensor flexível de temperatura de carga que pode ser livremente posicionado no interior da câmara. Existem transdutores de temperatura que convertem o sinal do DTR em sinal 4-20 mA para cada medição analógica de temperatura monitorada pelo CLP. De acordo com a figura 31, o sinal analógico de corrente correspondente à temperatura medida é inserido em um canal de entrada analógica no CLP.

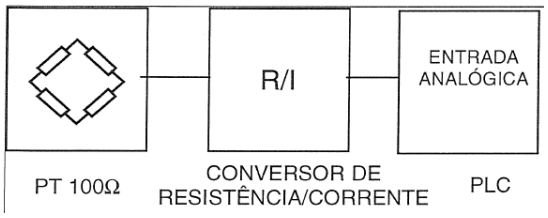

Figura 31 - Diagrama de blocos típico de medição de temperatura

2.1.1.3. Medição de Pressão

O transdutor de pressão da câmara foi testado a 121 °C sob vácuo total. A faixa de pressão funcional é de 0 - 400 kPa (0 - 58 psia) e a de temperatura é de 20 - 150 °C. Um sinal de saída de 4-20 mA fornece ao sistema de controle informações sobre a pressão.

2.1.1.4. Princípio da Regulagem da Válvula de Controle

Pressão, temperatura e fluxo são controlados pelos controladores de software PID (proporcional, integral e derivativo) conforme a figura 32.

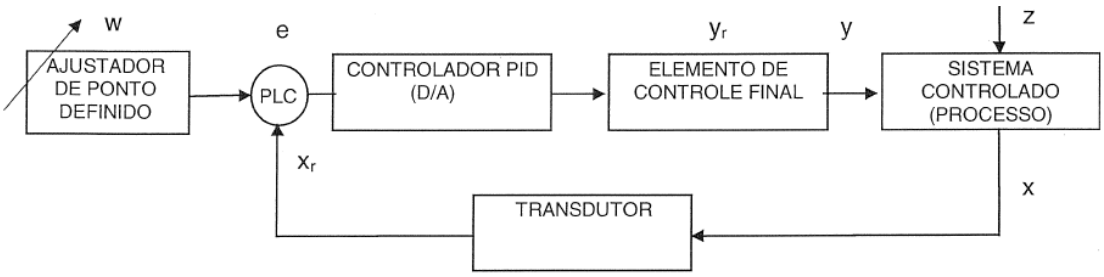

Figura 32 - Diagrama de blocos de controle proporcional

Em que:

w = Valor definido (ponto definido do controlador)

e = Valor de erro ou diferença entre o valor definido e o valor medido (w-x)

y_r = Sinal de controle analógico para válvula reguladora

y = Saída de válvula reguladora

z = Desvio do processo (Perturbação)

x = Valor medido (realimentação de informações para o controlador PID)

x_r = Sinal analógico para o CLP

D/A = Conversor Digital/Analógico

O controle PID da autoclave consiste, basicamente, em analisar o sinal de erro (e) - diferença entre o valor definido e o valor medido - e aplicar uma correção no sinal de controle analógico da válvula (y_r). O controlador PID é alimentado com o sinal de erro (*e)*, dependendo deste valor, atua de forma apropriada na válvula reguladora (y). Sendo assim, uma boa escolha dos parâmetros PID é necessária para o funcionamento adequado do sistema. Os parâmetros de PID ajustados na autoclave foram Kc = 110 (proporcional), Ti = 9 (integral) e Td = 0 (derivativo).

2.1.2. Sistema de aquisição de dados de temperatura

O equipamento utilizado para aquisição dos dados de temperatura foi um sistema de validação térmica marca GE Kaye, modelo Validador 2000 (figura 33) conectado a um notebook com sistema operacional Windows XP. Os sensores de temperatura foram termopares tipo T (composto de um filamento de cobre e outro de constantan) da marca GE Kaye modelo Prêmio com precisão 0,01°C.

Figura 33 - Sistema de aquisição de dados GE Kaye.

Este equipamento possui um sistema automático para calibração dos termopares utilizados, o que garante a confiabilidade dos resultados registrados. Antes e depois de cada ciclo, os termopares foram calibrados em forno (Hart Scientifc - modelo 9100 B), nos pontos de temperatura de 90ºC, 121°C e 134ºC, apresentando variação de temperatura de ± 0,2 ºC em relação ao termômetro de referência (PT 100, Kaye Instruments).

Este dispositivo é utilizado para a validação térmica e foi projetado de forma a atender os requisitos do FDA (2003) relacionados à proteção dos dados quanto à sua alteração ou perda, encontrando-se em conformidade com as exigências internacionais e européias de Boas Práticas de Fabricação para a inspeção de indústrias de produção de fármacos.

2.2. Materiais

Os materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho que fazem parte das montagens das cargas estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Materiais utilizados.

Item	***Quantidade***
Suporte plástico de ovos	660
Tyvek	20
Balão de 1 L	30
Erlenmeyer de 2 L	4
Frasco 125 ml	180
Frasco Nalgene	12

2.3. Métodos

2.3.1. Classificação das Cargas

Levando em consideração as particularidades pertinentes aos itens que compõem a carga, ela foi dividida em duas categorias:

- Cargas Secas (tabela 5): têm o objetivo de colocar o vapor em contato com o micro-organismo através de seus poros e/ou suas embalagens. Há necessidade de remoção do ar, da penetração e da saída do vapor e reevaporação da umidade do material.
- Cargas Líquidas (tabela 6): o líquido do produto reage com o micro-organismo para inativá-lo, então o objetivo é aquecer uniformemente o líquido.

Tabela 5 - Cargas Secas

Identificação do ciclo	CICLO 01	
Temperatura de Exposição	121 °C	
Tempo de Exposição	00:25:00	**hh:min:seg**
Pré-Condicionamento	3 pulsos de vácuo	
Pós-Condicionamento	1 pulso de vácuo	
Item	**Embalagem**	**Quant.**
Tyvek	Papel Grau Cirúrgico	20
Identificação do ciclo	CICLO 02	
Temperatura de Exposição	121 °C	
Tempo de Exposição	00:25:00	**hh:min:seg**
Pré-Condicionamento	3 pulsos de vácuo	
Pós-Condicionamento	1 pulso de vácuo	
Item	**Embalagem**	**Quant.**
Suporte Plástico de Ovos	Papel Grau Cirúrgico	660

Tabela 6 - Carga Líquida

Identificação do ciclo	CICLO 03	
Temperatura de Exposição	121 °C	
Tempo de Exposição	00:37:00	**hh:min:seg**
Pré-Condicionamento	Vapor fluente	
Pós-Condicionamento	Resfriamento natural	
Item	**Embalagem**	**Quant.**
Erlenmeyer de 2 L com água	Sem embalagem	4
Frasco 125 ml com água	Caixa Plástica	18
Identificação do ciclo	CICLO 04	
Temperatura de Exposição	121 °C	
Tempo de Exposição	01:00:00	**hh:min:seg**
Pré-Condicionamento	Vapor fluente	
Pós-Condicionamento	Resfriamento natural	
Item	**Embalagem**	**Quant.**
Balão de 1 L com glutamato	Papel Grau Cirúrgico	10

2.3.2. Distribuição Térmica da Autoclave

O estudo térmico da autoclave fornece a distribuição térmica na câmara interna destacando os pontos quentes e frios. Foi executado com três corridas para mostrar a reprodutibilidade do sistema. Cada tipo de ciclo (seco e líquido), por apresentar particularidades distintas, foi testado separadamente. Os pontos monitorados foram os instrumentos de controle e as extremidades da câmara. O instrumento de controle para cargas secas é o sensor de dreno e para cargas liquidas é o sensor de carga. Para cada estudo, foram espalhados 11 termopares tipo T equidistantemente na câmara interna e um adjacente ao sensor de controle, conforme a figura 34, que coletavam dados a cada 30 segundos. Foram definidos os limites máximo (124°C), mínimo (120°C) e o limite de variação entre os sensores (±2°C), apenas na fase tempo de exposição.

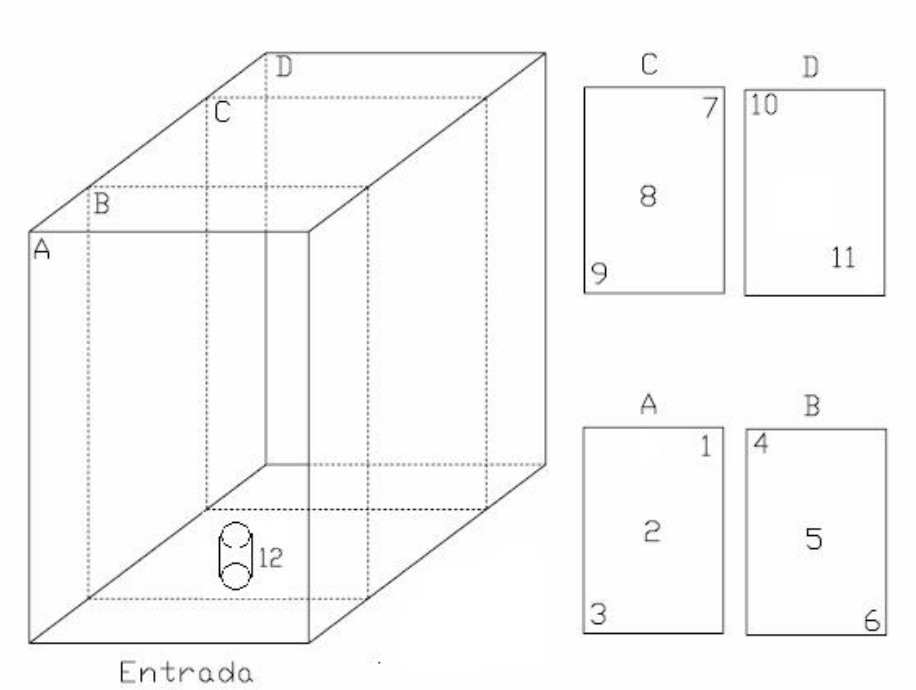

Figura 34 - Distribuição dos Sensores de Temperatura.

2.3.3. Penetração de Vapor na Carga

Os mesmos termopares utilizados no estudo em vazio foram utilizados nos estudos térmico das cargas, mas agora inseridos no interior dos itens da carga. Também foram executadas três corridas para cada ciclo das Tabelas 5 e 6. O objetivo não é avaliar a homogeneidade térmica entre os itens das cargas e sim avaliar a penetração de vapor na embalagem e nos poros da carga. Isto foi feito através da letalidade acumulada em cada item. Normalmente é usada como referência a mínima letalidade acumulada. Ela foi calculada automaticamente pelo GE Kaye Validador 2000, durante todo tempo em que os sensores ficaram acima de 100°C, através da equação (10).

$$Fo = \int_{t_1}^{t_2} 10^{\frac{T - 121,1°C}{Z}} dt \qquad (10)$$

Foram espalhados aleatoriamente 12 termopares (um em cada item da carga), onde as posições foram diferentes em cada estudo, abrangendo todas as áreas da autoclave ao longo do tempo. Nestes estudos, também foram coletados dados a cada 30 segundos. A fim de avaliar o comportamento do vapor em diversos itens com formatos distintos, não foi posicionado mais de um sensor no mesmo item

ou em itens idênticos. Foram usadas posições aleatórias para a maioria dos sensores e fixado um sensor no ponto frio. Para obter uma margem de segurança satisfatória, todos os ciclos foram dimensionados de acordo com a equação (12), para fornecer um SAL de 10^{-6} a uma população de $1x10^{6}$ de valor D de 2 minutos, ou seja, todos os ciclos devem acumular uma letalidade mínima de 24 min.

$$\begin{aligned} F_0 &= D_{121°C}(\log_{10} N_0 - \log_{10} B) \\ F_0 &= 2x(\log_{10} 1x10^{6} - \log_{10} 10^{-6}) \\ F_0 &= 24\,\text{min} \end{aligned} \qquad (12)$$

2.3.4. Desafio Microbiológico

Para o desafio microbiológico foram utilizados indicadores biológicos contendo o *Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953* (figura 35). Para as cargas secas foram utilizados indicadores Esporofar da marca Cefar contendo 1,11 x 10^{6} UFC / fita com valor D de 1,37 minutos. Para as cargas liquidas foram utilizados indicadores Sterikon da marca Merck contendo 1,50 x 10^{6} UFC / ampola com valor D de 1,90 minutos.

Figura 35 - Indicadores biológicos tipo fita e ampolas.

O desafio microbiológico foi executado simultaneamente com o estudo térmico com carga. Os indicadores biológicos foram fixados junto aos termopares conforme indicado na figura 36. Para cada termopar utilizado, foi fixada uma fita ou ampola de indicador biológico.

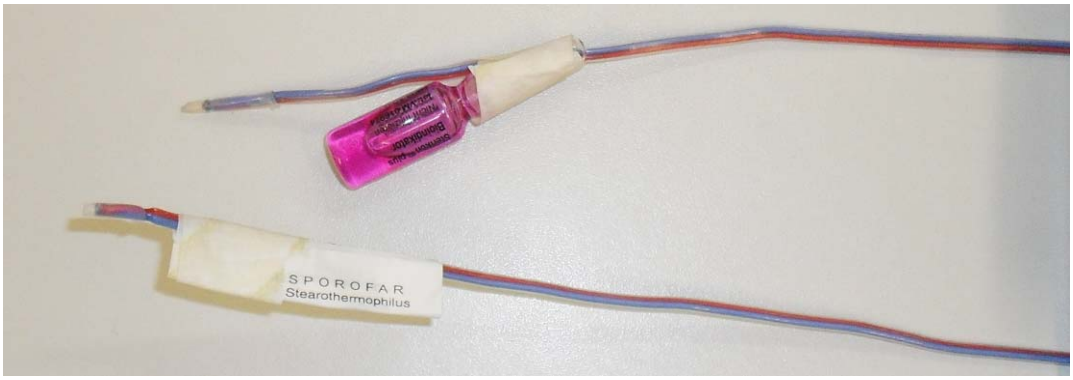

Figura 36 - Fixação dos indicadores biológicos junto aos termopares.

Como foi utilizado nas validações o método de sobremorte (sobremorte), onde a probabilidade de sobrevivência é de 10^{-6}, o objetivo deste teste foi obter resultados qualitativos (positivo ou negativo) e não quantitativos (número da população sobrevivente). Apesar de parecer um exagero ou perda de tempo, é necessário desafiar indicadores biológicos em ciclos onde a letalidade mínima (24 minutos) é maior que a exigida pelos mesmos (16,50 minutos para as cargas secas e 23,13 minutos para as cargas liquidas), uma vez que existe o risco de não obter sucesso no desafio microbiológico. Isto se deve ao fato que a esterilização a 121°C só é eficaz no calor úmido e, nestes casos, os termopares não tem como sinalizar se aquela temperatura medida está ou não na presença do vapor.

Estes indicadores biológicos foram incubados, após a exposição, a 56 ºC por 48 horas, e observados quanto ao crescimento microbiológico. Como critério de aceitação, todos os pontos deveriam acumular um F_0 maior que a letalidade mínima requerida e nenhum indicador biológico deveria apresentar, após o período de incubação, a alteração da coloração do seu meio para amarelo, o que indicaria crescimento microbiano (Figura 37).

Figura 37 - Alteração da cor do indicador biológico de um resultado positivo.

2.3.5. Cálculo da Capacidade de Esterilização (Cpk)

O objetivo deste teste é verificar se a autoclave é capaz de esterilizar uma determinada carga. A razão da capacidade do processo de esterilização da autoclave (Cpk) deve ser ≥ 1,33, caso contrário, deve-se investigar se a causa desta incapacidade está relacionada com as funcionalidades da autoclave ou com a montagem do carregamento.

Usando os dados coletados pelos termopares, somente durante o tempo de exposição a 121°C, calculou-se o Cpk de cada corrida pela equação (19):

$$Cpk = Mínimo\left[\left(\frac{LSE - \bar{x}}{3\sigma}\right),\left(\frac{\bar{x} - LIE}{3\sigma}\right)\right] \quad (18)$$

Em que:

$\bar{x}$ = média de todas as medições durante o tempo de exposição a 121°C.

σ = desvio padrão de todas as medições durante o tempo de exposição a 121°C.

Cpk = índice de capacidade do processo

LSE = Limite de especificação superior (124°C)

LIE = Limite de especificação inferior (120°C)

2.3.6. Planejamento Fatorial das Variáveis da Esterilização (2^k)

Segundo a ISO11134 (2001), a requalificação é recomendada se mudanças significativas são feitas na autoclave, processos, produtos ou embalagens. Entretanto, na prática é difícil de mensurar o nível de significância de uma mudança, sem saber o real impacto destes fatores no processo de esterilização.

Com o objetivo de avaliar o impacto de uma mudança e compreender a relação entre os fatores e suas interações para o processo de esterilização por calor úmido, foi utilizado o planejamento fatorial 2^3. Neste foram definidos os três fatores que mais sofrem mudanças, devido à dinâmica do processo produtivo: densidade da carga (quantidade de itens), embalagem do produto e localização na câmara interna.

Os fatores de interesse (variáveis) e seus níveis de avaliação estão identificados na Tabela 7. É fundamental determinar a interação estatística entre as

variáveis para avaliar a necessidade de requalificação de performance após mudança.

Tabela 7 - Tabela de Fatores

Fatores	(-)	(+)
A - Posição	Ponto Frio	Ponto Quente
B - Embalagem	Única	Tripla
C - Quantidade	1 Frasco	12 Frascos

A câmara interna foi dividia em doze seções longitudinais, cada uma delas contendo um termopar no centro, conforme a figura 38. Antes de iniciar o planejamento, foram realizadas três corridas com a autoclave vazia para determinar os dois níveis do fator A (ponto frio e ponto quente). Nas três corridas realizadas, as máximas temperaturas foram registradas na seção 1 e as mínimas temperaturas foram registradas na seção 9.

Vista Superior

	1 **Quente**	4	7	10
Porta Carregamento	2	5	8	11
	3	6	9 **Frio**	12

Figura 38 - Localização dos pontos quente e frio.

Tendo como ponto de partida três fatores e dois níveis, executou-se um planejamento fatorial 2^3, que consiste em realizar ensaios e registrar as respostas observadas em todas as possíveis combinações desses níveis, conforme esquematizado na Tabela 8. O experimento foi realizado com frascos Nalgene® de 1L, combinando sua quantidade em 1 ou 12 frascos; sua embalagem em 1 ou 3 folhas de papel grau cirúrgico e a posição entre a seção 1 ou 9. Manteve-se um termopar em cada das 12 seções, mas quando havia frasco, o termopar ficava inserido no mesmo. A quantidade máxima equivale a um frasco por seção e a quantidade mínima equivale apenas em um frasco em toda câmara, estando ele no ponto frio ou no ponto quente. A montagem do planejamento está ilustrada na figura 39.

Tabela 8 – Combinações possíveis dos fatores

Ensaio	*POSIÇÃO*	*EMBALAGEM*	*QUANTIDADE*	A	B	C
1	*PONTO FRIO*	*ÚNICA*	*MÍNIMA*	Seção 9	1 Folha	1 Frasco
2	*PONTO QUENTE*	*ÚNICA*	*MÍNIMA*	Seção 1	1 Folha	1 Frasco
3	*PONTO FRIO*	*TRIPLA*	*MÍNIMA*	Seção 9	3 Folhas	1 Frasco
4	*PONTO QUENTE*	*TRIPLA*	*MÍNIMA*	Seção 1	3 Folhas	1 Frasco
5	*PONTO FRIO*	*ÚNICA*	*MÁXIMA*	Seção 9	1 Folha	12 Frascos
6	*PONTO QUENTE*	*ÚNICA*	*MÁXIMA*	Seção 1	1 Folha	12 Frascos
7	*PONTO FRIO*	*TRIPLA*	*MÁXIMA*	Seção 9	3 Folhas	12 Frascos
8	*PONTO QUENTE*	*TRIPLA*	*MÁXIMA*	Seção 1	3 Folhas	12 Frascos

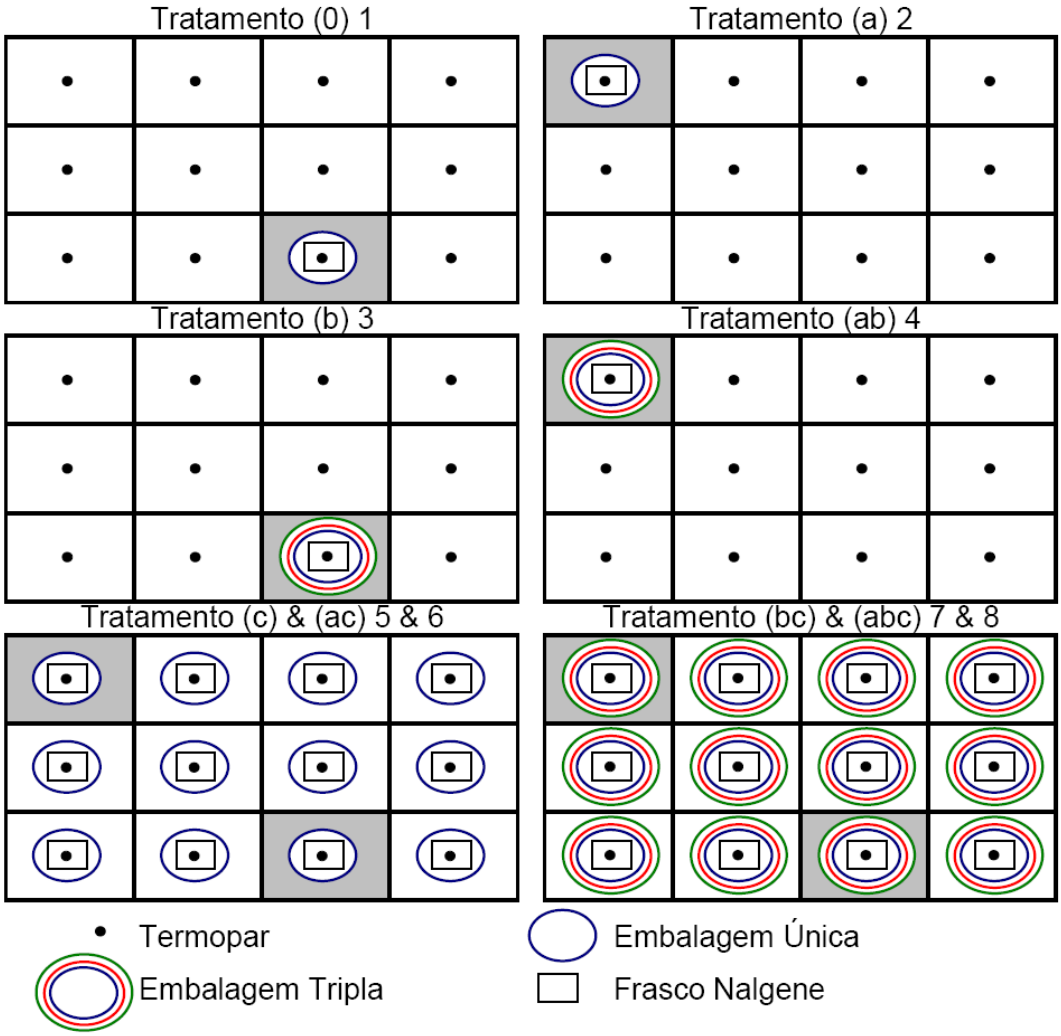

Figura 39 - Montagem do planejamento.

A matriz de planejamento é a listagem das combinações apresentadas na Tabela 9, juntamente com os resultados obtidos nos experimentos. Observa-se que os ensaios foram feitos em triplicata produzindo 24 respostas no total. Isso nos permitirá obter uma estimativa do erro experimental associado à determinação de

uma resposta individual. A extensão desse erro será importante para decidirmos se existe ou não efeitos estatisticamente significativos dos fatores sobre a resposta. Os resultados serão apresentados em duas respostas: letalidade mínima acumulada (F_0) e índice de capacidade inferior (Cpi).

Tabela 9 - Planejamento dos Ensaios

Tratamento	A	B	C	Resultados - n=3			Média
0	-1	-1	-1				
(a)	1	-1	-1				
(b)	-1	1	-1				
(ab)	1	1	-1				
(c)	-1	-1	1				
(ac)	1	-1	1				
(bc)	-1	1	1				
(abc)	1	1	1				

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Distribuição Térmica na Autoclave

Devido às particularidades pertinentes de cada ciclo, as corridas dos ciclos secos e líquidos foram analisadas separadamente.

3.1.1. Ciclo Seco

Na figura 40 estão traçados os mapeamentos térmicos das três corridas consecutivas realizadas na autoclave com a câmara interna vazia.

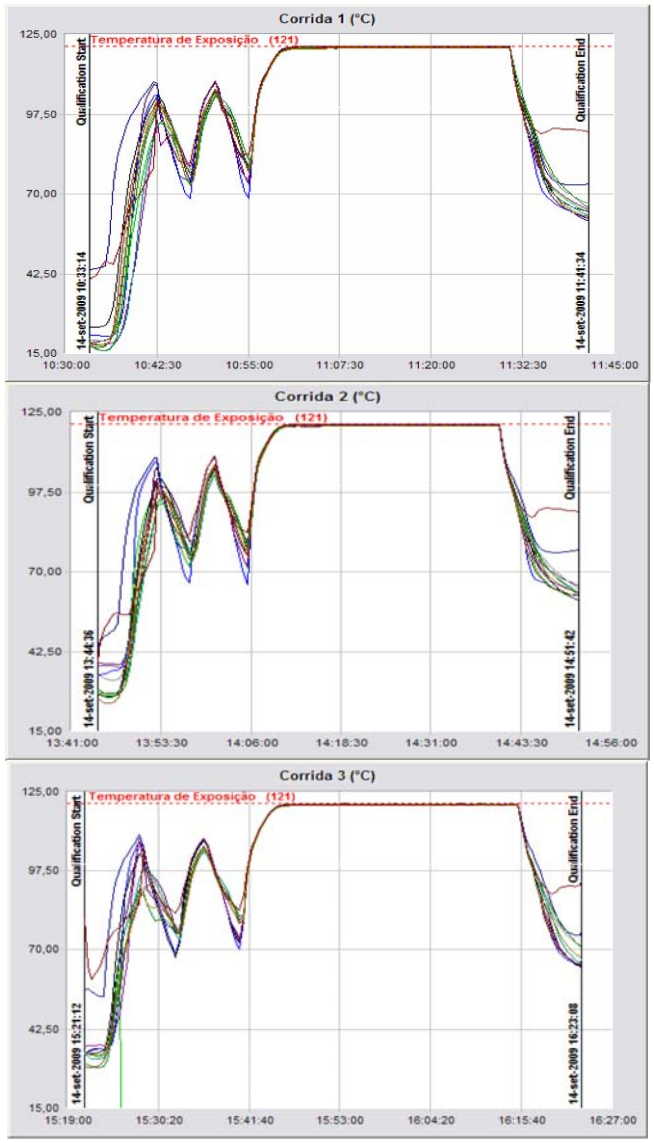

Figura 40 - Gráfico de temperatura das três corridas com a autoclave vazia.

O mapeamento térmico confirmou a distribuição homogênea de calor nos 12 pontos distribuídos na câmara durante o tempo de exposição a 121°C. A parametrização entre os gráficos destaca as equivalências nas fases de pré-condicionamento, tempo de exposição e pós-condicionamento entre as três corridas, confirmando a reprodutibilidade operacional do ciclo.

Para uma análise estatística foram selecionados os últimos 20 minutos de cada corrida, da fase do tempo de exposição a 121°C, dando um total de 480 amostras.

A figura 41 mostra os diagramas de caixa (*box plot*) comparativos para os dados térmicos das três corridas. Esses diagramas indicam que não existem diferenças relevantes entre as medianas das três corridas, embora a segunda corrida tenha apresentado uma variabilidade amostral um pouco maior. Na Tabela 10 estão registrados os dados estatísticos básicos das medições.

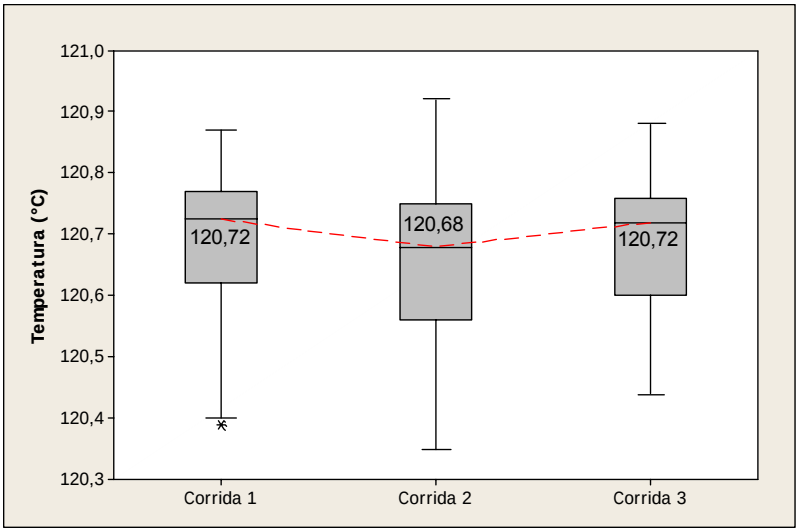

Figura 41 - *Box pot* para as três corridas com autoclave vazia e ciclo seco.

Tabela 10 - Resumo do mapeamento térmico da autoclave a 121°C por 20 minutos.

	Média (°C)	Mínima (°C)	Máxima (°C)	Desvio Padrão (°C)	Amplitude (°C)
Corrida 1	120,69	120,39	120,87	0,10	0,48
Corrida 2	120,66	120,35	120,92	0,12	0,57
Corrida 3	120,68	120,44	120,88	0,11	0,44

Pode-se notar avaliando os resultados da tabela 13 que, na câmara interna, comparando as três corridas, as temperaturas variaram entre 120,35°C e 120,92°C, não ultrapassando os limites estabelecidos entre 120°C e 124°C. A diferença máxima entre os sensores foi de 0,57°C, respeitando a variação máxima de ± 2°C.

Para avaliar o sistema de controle de temperatura, foram utilizados gráficos de controle para medidas individuais do termopar que foi fixado junto ao sensor de controle da autoclave. Foi utilizada a amplitude móvel de duas observações consecutivas como base para estimar a variabilidade do sistema de controle. Estes gráficos estão ilustrados nas figuras 42, 43 e 44.

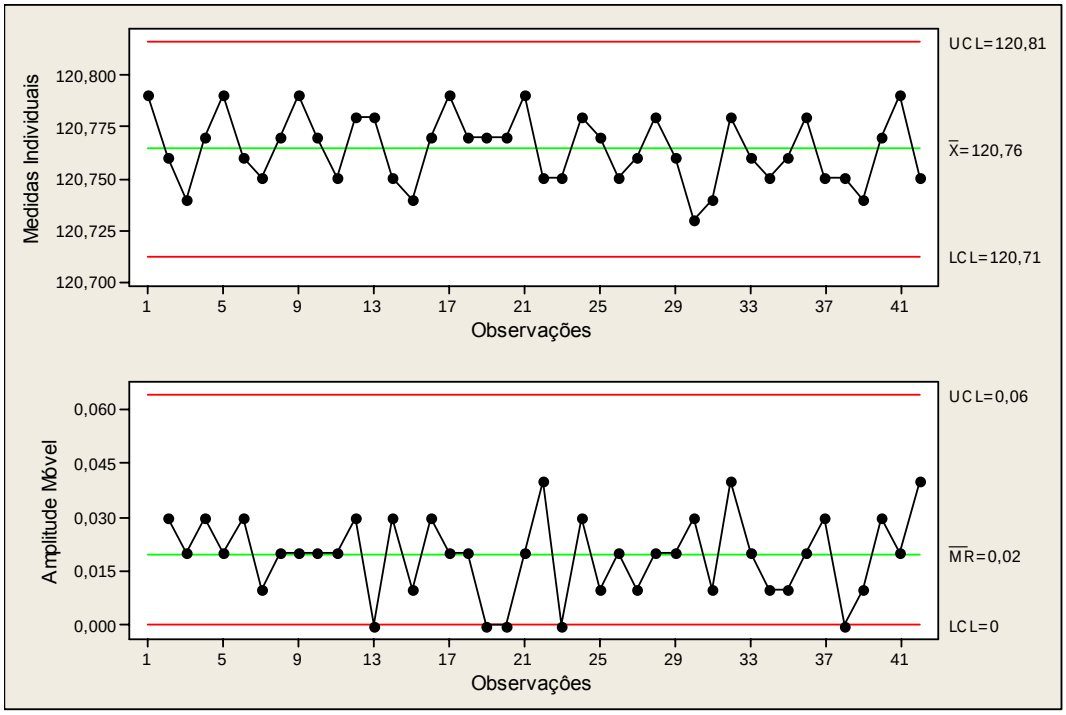

Figura 42 - Gráfico de controle para observações individuais e a amplitude móvel do controle da primeira corrida.

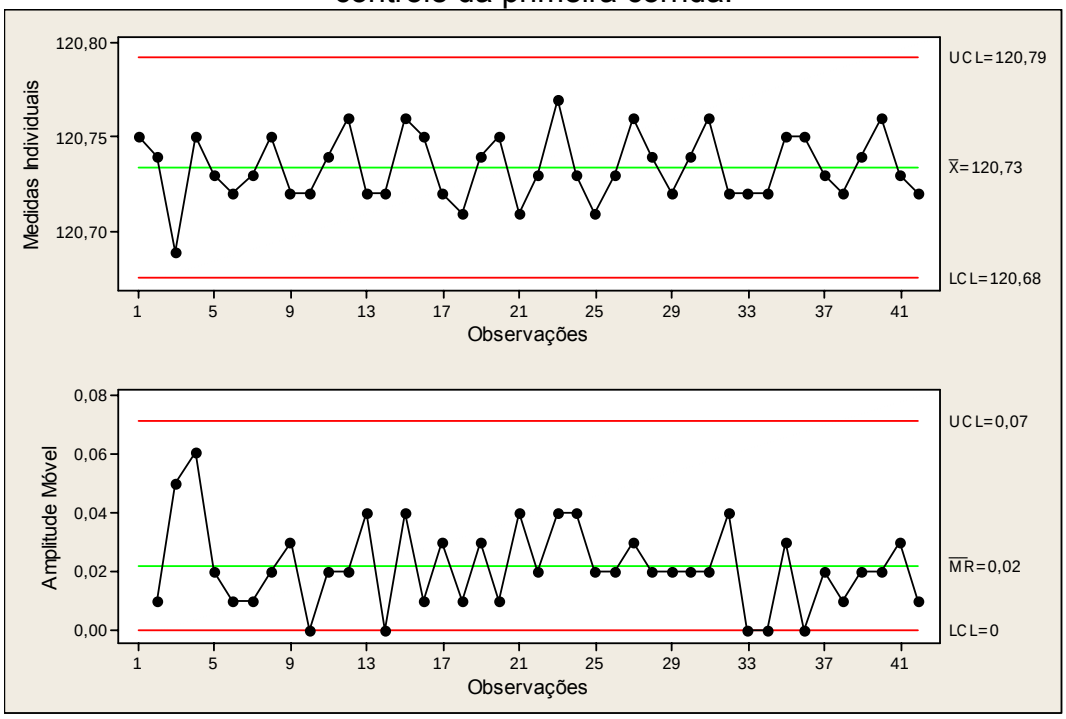

Figura 43 - Gráfico de controle para observações individuais e a amplitude móvel do controle da segunda corrida.

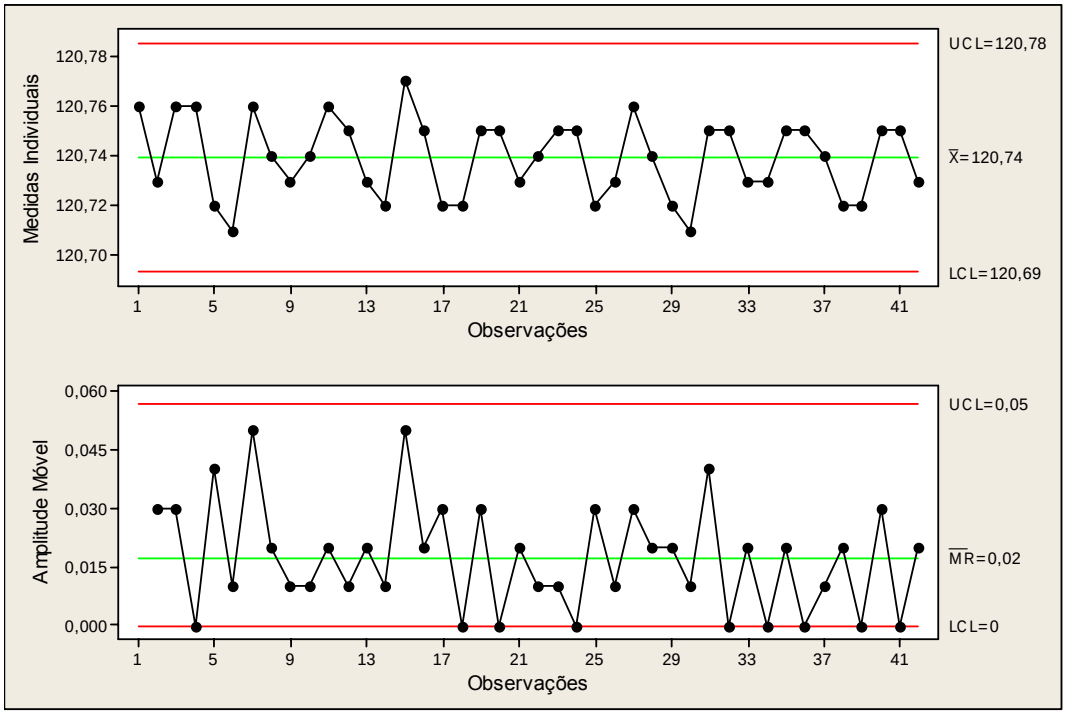

Figura 44 - Gráfico de controle para observações individuais e a amplitude móvel do controle da terceira corrida.

Nas três corridas, não foi observado nenhum deslocamento significativo nas médias amostrais de 120,76, 120,73 e 120,74 que resultassem em pontos fora do limite de controle ou em um padrão seqüencial em um dos lados da linha central. Conseqüentemente, nas médias das amplitudes móveis, que foram de 0,02 nas três corridas, não foram encontrados picos expressivos que indicassem deslocamentos nas medias do controle.

Os parâmetros PID do sistema de controle de temperatura da autoclave estão bem sintonizados. A malha de controle apresentou baixo tempo de acomodação e nenhum valor de pico no período transitório. Também se mostrou bem estável durante o tempo de exposição, pois apresentou um erro estacionário médio de apenas 0,26°C e amplitude móvel média de 0,02°C. Com isto não há nenhuma evidência que a autoclave opere fora de controle.

3.1.2. Ciclo Líquido

Na figura 45 estão traçados os mapeamentos térmicos das três corridas consecutivas realizada na autoclave com a câmara interna vazia.

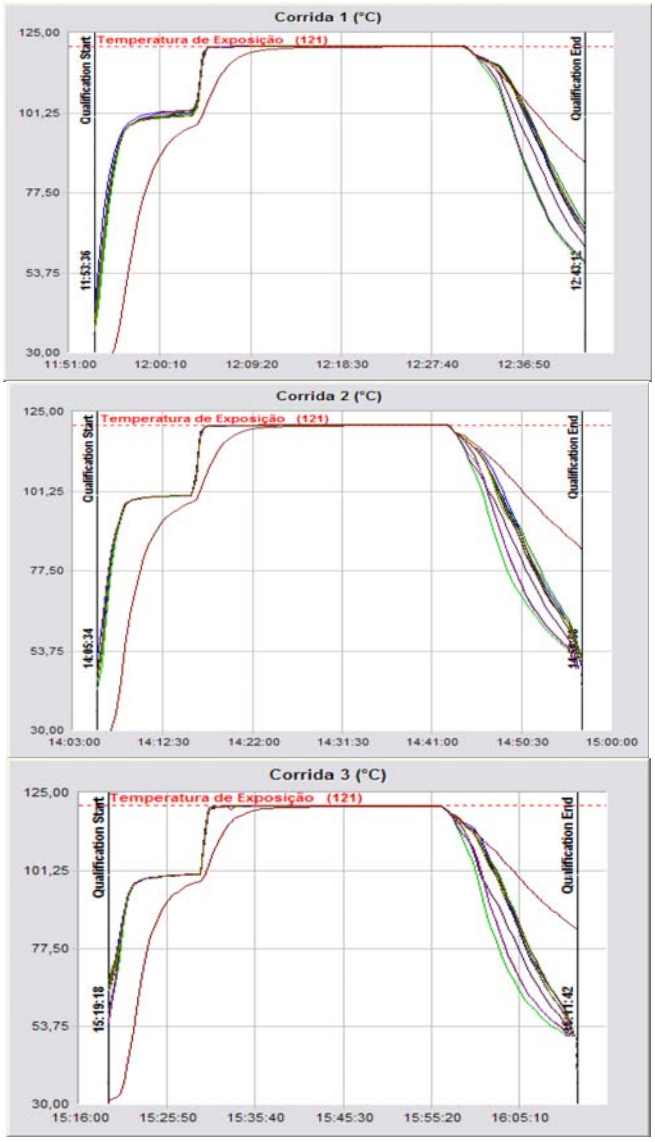

Figura 45 - Gráfico de temperatura das três corridas com a câmara vazia no ciclo líquido.

O mapeamento térmico confirmou a distribuição homogênea de calor nos 11 pontos distribuídos na câmara, mesmo antes que o sensor de controle chegasse a 121°C. Este retardo de medição no sensor de controle já era esperado, pois o mesmo fica imerso num recipiente com água durante todo o ciclo. A parametrização entre os gráficos também destaca as equivalências nas fases de esterilização entre as três corridas, confirmando a reprodutibilidade operacional do ciclo.

A ausência de pulsos de vácuos neste tipo de ciclo dificulta uma análise estatística, pois a mistura ar e vapor na câmara interna gera muitos ruídos nas medições. O ar é um grande isolante térmico que dificulta a homogeneidade térmica no interior da câmara. Então, para avaliar o desempenho térmico deste tipo de ciclo, basta certificar que as três corridas ultrapassaram a letalidade mínima requerida de 24 F_0. Isto pode ser visto na figura 46.

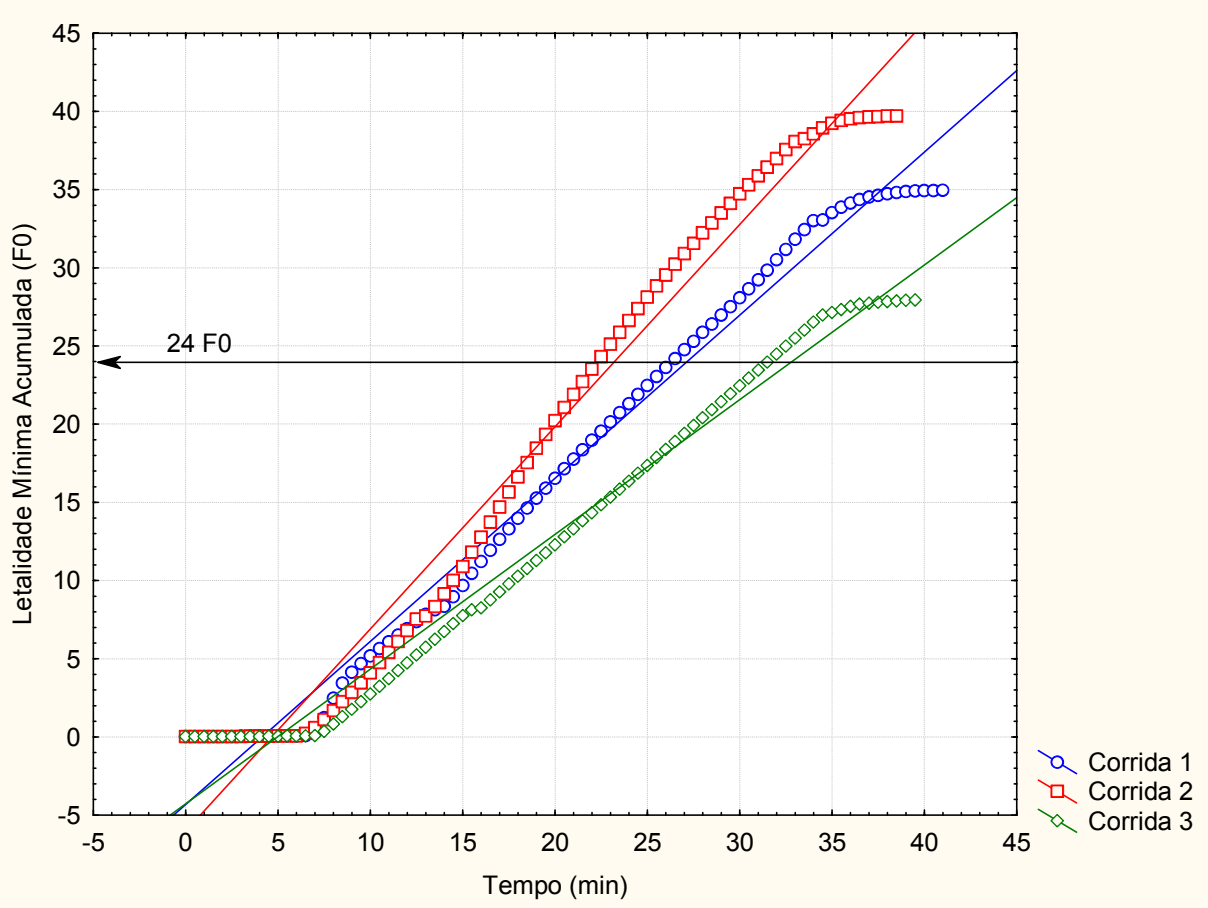

Figura 46 - Letalidade mínima acumulada nas 3 corridas vazias.

A reprodutibilidade operacional e a equivalência estatística dos dados indicam que a distribuição térmica da autoclave, sem carga, é homogênea. Uma vez que o posicionamento dos itens da carga pode dificultar o trânsito do vapor, podemos diagnosticar com mais confiança que qualquer anomalia da distribuição térmica é conseqüência da arrumação das cargas e não do sistema operacional da autoclave.

3.2. Penetração de Vapor nas Cargas

3.2.1. Cargas Secas

Nas figuras 47 e 48 estão traçados as temperaturas médias, máximas e mínimas (verde, azul e roxo, respectivamente) ao longo do tempo das três corridas do ciclo 1 (20 unidades de *Tyvek)* e ciclo 2 (660 unidades de suporte plásticos de ovos). Além das temperaturas, estão traçados em preto, as rampas da letalidade mínima acumulada.

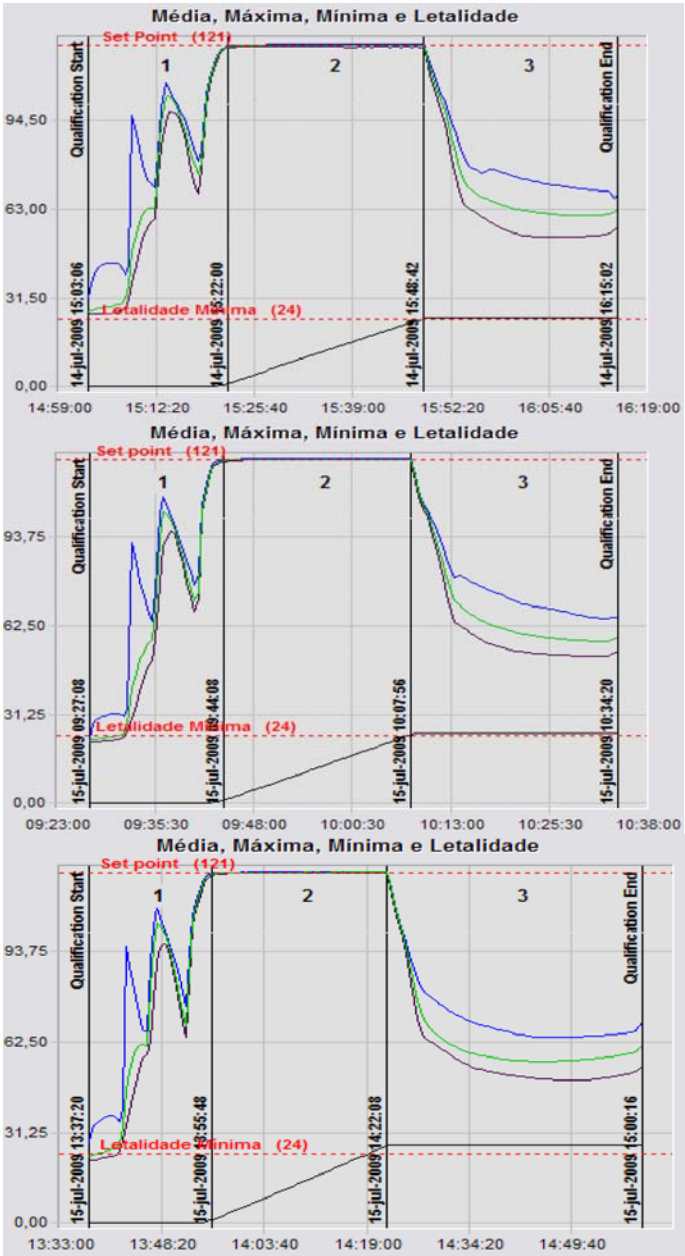

Figura 47 - Letalidade e as temperaturas das tres corridas ciclo 1.
1 – Pré-cond. 2 – Tempo de Exposição 3 – Pós-cond

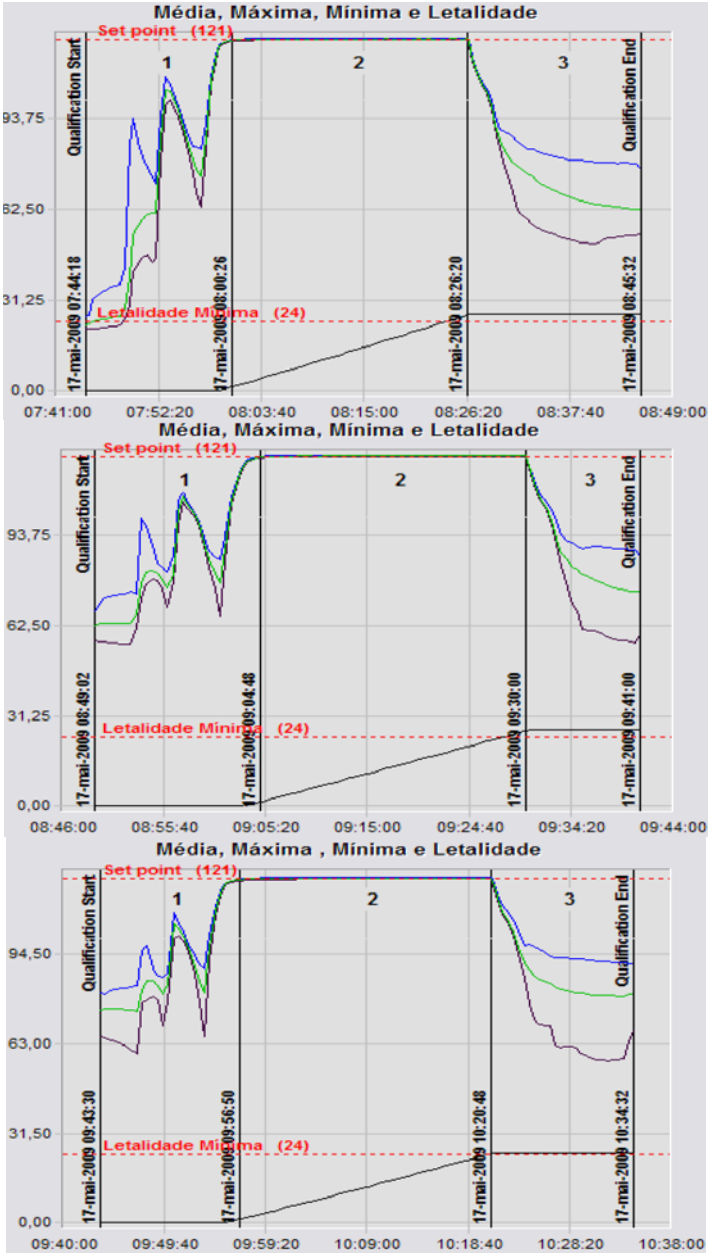

Figura 48 - Letalidade e as temperaturas das três corridas ciclo 2.
1 – Pré-cond. 2 – Tempo de Exposição 3 – Pós-cond

Durante o tempo de exposição, nenhuma das três corridas dos ciclos 1 e 2, apresentaram diferenças significativas entre as linhas média, máxima e mínima. Pode-se observar que, em todas as corridas, a letalidade mínima acumulou mais que 24 minutos de F_0, antes que terminasse o tempo de exposição a 121°C (a menor letalidade acumulada foi de 24,03 minutos de F_0 na primeira corrida do ciclo 1). A parametrização entre os gráficos destaca as equivalências nas fases de pré-condicionamento, tempo de exposição e pós-condicionamento entre as três corridas de cada ciclo, confirmando a reprodutibilidade operacional dos ciclos 1 e 2.

Os dados coletados durante a validação das cargas secas estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Resumo do mapeamento térmico das cargas secas

Carga		Amostras	Média (°C)	Mínimo (°C)	Máximo (°C)	Amplitude (°C)
Ciclo 1	**Corrida 1**	648	121,05	120,03	121,58	1,55
	Corrida 2	588	121,00	120,06	121,30	1,24
	Corrida 3	660	121,02	***119,84***	121,25	1,41
Ciclo 2	**Corrida 1**	648	121,03	120,29	121,44	1,15
	Corrida 2	636	121,10	120,52	121,48	0,96
	Corrida 3	600	121,07	120,18	121,49	1,31

Podemos notar que, tanto no ciclo 1 como no ciclo 2, as temperaturas médias das três corridas ficaram próximas ao valor de controle de temperatura da autoclave de 121°C. Isto demonstra que os parâmetros de controle PID ajudados no estudo em vazio podem ser replicados para os estudos com carga, sem a necessidade de reajuste. A diferença máxima entre os sensores foi de 1,55°C, respeitando a variação máxima permitida de ± 2°C.

A temperatura mínima da terceira corrida do ciclo 1, de 119,84°C, foi menor que o limite inferior de especificação (120°C). Neste momento seria prematuro reprovar esta corrida, sem antes fazer uma analise estatística de todos dos dados coletados durante todo tempo de exposição. Então para este caso foi escolhida a análise da capacidade do processo. Os valores estão listados na Tabela 12.

Tabela 12 - Analise da capacidade do processo.

Carga		LSE	LIE	$\frac{LSE - \bar{x}}{3\sigma}$	$\frac{\bar{x} - LIE}{3\sigma}$	Cpk
Ciclo 1	**Corrida 1**	124	120	3,74	1,34	1,34
	Corrida 2			6,48	2,15	2,15
	Corrida 3			5,60	1,91	1,91
Ciclo 2	**Corrida 1**			6,61	2,30	2,30
	Corrida 2			7,11	2,68	2,68
	Corrida 3			6,29	2,30	2,30

Em todas as corridas, o índice de capacidade do processo foi referente ao limite inferior de especificação. Nele podemos afirmar que os ciclos 1 e 2 são capazes de esterilizar suas respectivas cargas, já que todas as corridas

apresentaram Cpk > 1,33. Segundo a figura 49, podemos observar que o ciclo 1 apresentou valores mais dispersos em relação à média, tornando-o menos capaz que o ciclo 2. O Cpk é um bom indicador para determinação do “pior caso” para as cargas secas, pois com ele podemos selecionar a carga que apresentou o menor Cpk (pior desempenho térmico) para que seja sempre utilizada nas revalidações periódicas. Se a autoclave, ao longo dos anos, for capaz de esterilizar a carga que apresentou baixo Cpk, certamente será capaz de esterilizar as demais.

A revalidação periódica apenas do “pior caso” é muito importante no ponto de vista estratégico de produção. Ela garante a qualidade do processo de esterilização sem afetar a capacidade de produção, já que diminui o tempo de parada de máquina.

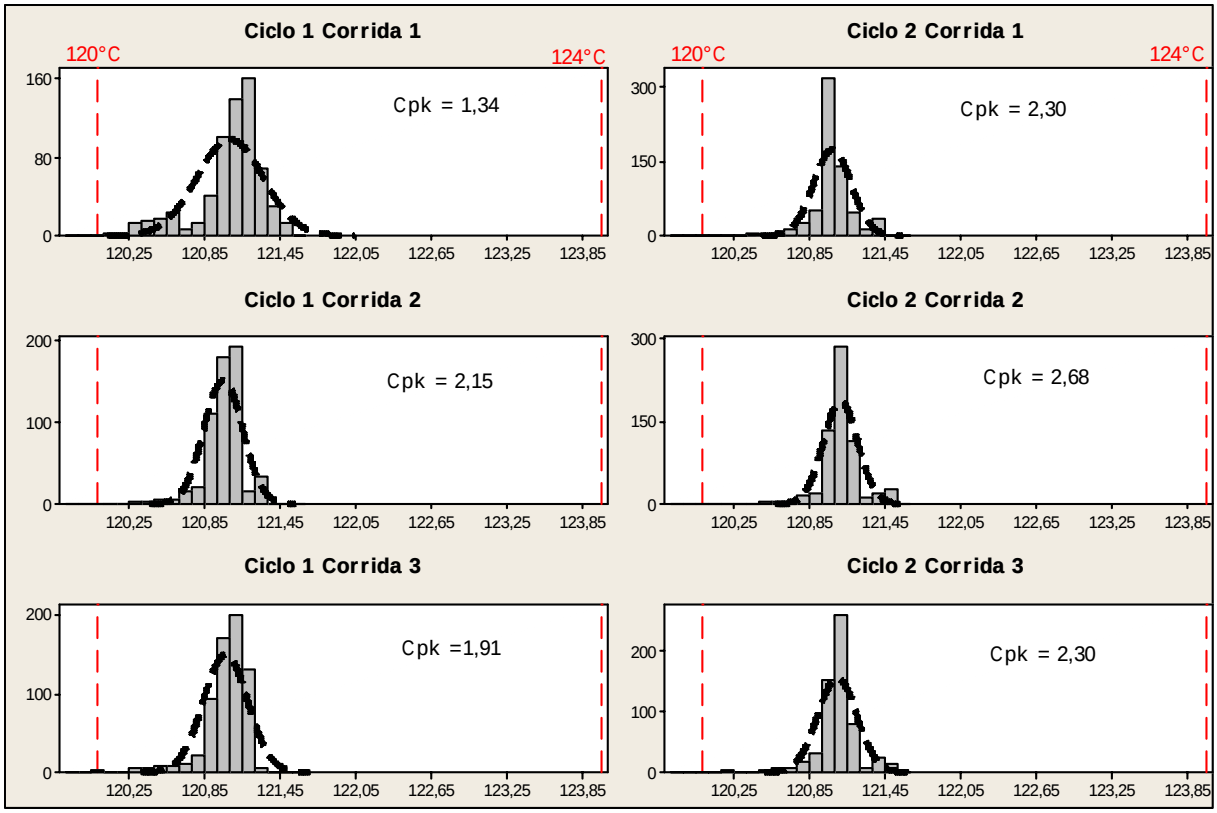

Figura 49 - Gráfico de capacidade do processo - Cpk.

A terceira corrida do ciclo 1, apesar de apresentar a temperatura mínima de 119,84°C, não pode ser classificada como a pior corrida, já que apresentou um Cpk (1,91) maior que a corrida 1 do ciclo 1 (1,34). Possivelmente a medição de 119,84°C se deveu ao fato de que, nos instantes iniciais do tempo de exposição, a malha de controle ainda estava em amortecimento. Uma vez alcançada a estabilização, as demais temperaturas ficaram entre 120°C e 124°C.

3.2.2. Cargas Líquidas

Nas figuras 50 e 51 estão traçados os mapeamentos térmicos ao longo do tempo das três corridas do ciclo 3 (4 *Erlenmeyers* de 2 L com água e 18 frascos de 125ml com água) e ciclo 4 (10 balões de 1 L de glutamato).

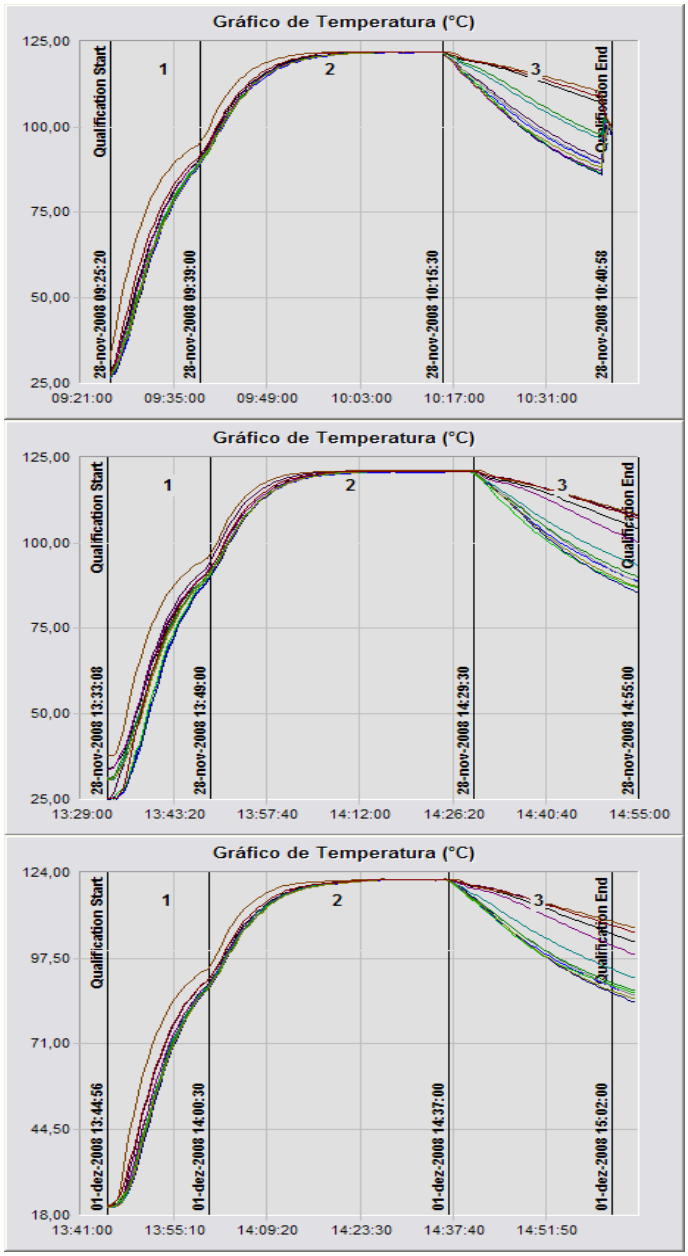

Figura 50 - Mapeamento térmico das tres corridas ciclo 3.
1 – Pré-cond. 2 – Tempo de Exposição 3 – Pós-cond

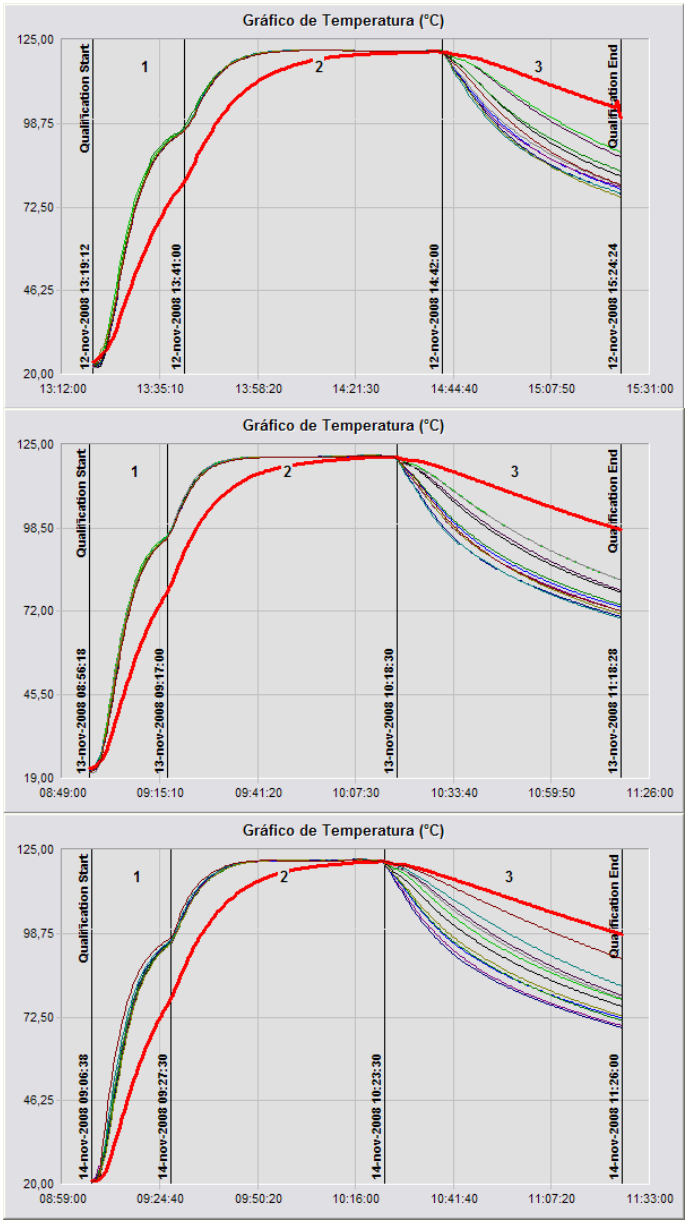

Figura 51 - Mapeamento térmico das três corridas ciclo 4. Acurva em vermelho demonstra que neste ponto a resistência térmica foi maior.
1 – Pré-cond. 2 – Tempo de Exposição 3 – Pós-cond

A parametrização entre os gráficos destaca as equivalências nas fases de pré-condicionamento, tempo de exposição e pós-condicionamento entre as três corridas de cada ciclo, confirmando a reprodutibilidade operacional dos ciclos 3 e 4.

A análise da homogeneidade térmica não se aplica aos ciclos líquidos, pois os mesmos não apresentam um tempo de exposição a 121°C definido. Por estarem inseridos em liquido, os termopares têm que vencer a inércia térmica do meio para alcançar a temperatura de exposição. Em muitos casos, a letalidade requerida é alcançada antes mesmo que o tempo de exposição chegue ao fim. Então por esta razão, a analise é feita pela curva de aquecimento e letalidade acumulada.

Nas três corridas do ciclo 3, todos os termopares tenderam a 121°C sem destacar uma diferença significativa entre as curvas, confirmando distribuição homogênea de calor. Entretanto, no ciclo 4, as três corridas, destacaram uma divergência visível em uma curva (destacada em vermelho) em relação às demais, demonstrando que neste ponto de medição a resistência térmica é maior.

Nas figuras 52 e 53 estão os gráficos de letalidade acumulada das três corridas de cada ciclo.

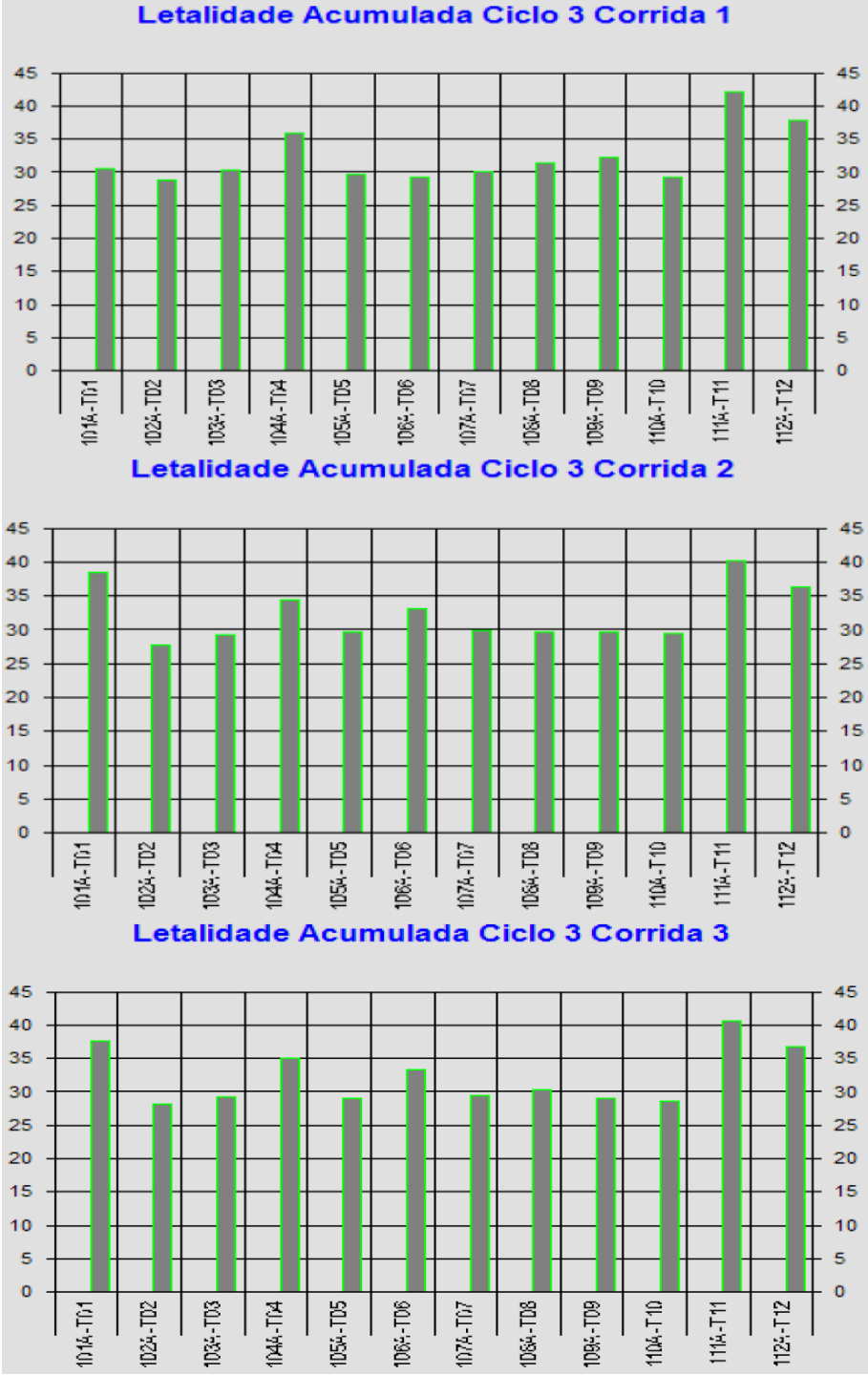

Figura 52 - Letalidade acumulada das três corridas do ciclo 3.

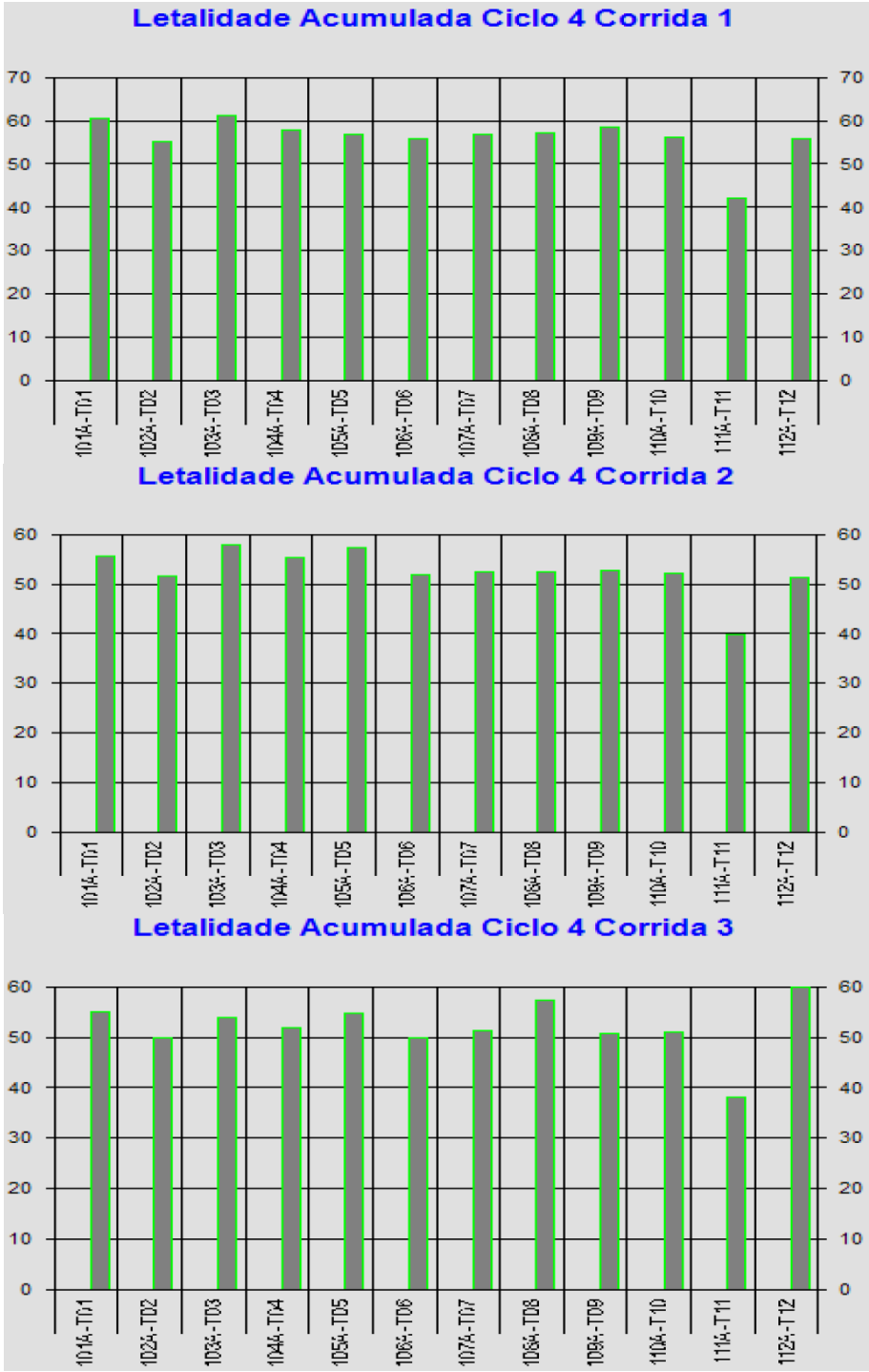

Figura 53 - Letalidade acumulada das três corridas do ciclo 4.

Nos gráficos de letalidade acumulada, os valores variaram entre 27,67 e 61,22 minutos nas três corridas do ciclo 3 e 4. Esta variação é resultante dos diferentes tempos de exposição e das variações de temperaturas em relação à localização dos termopares. Como os ciclos foram dimensionados para acumular letalidade maior que 24 minutos para todos os termopares, pode-se concluir que, apesar da variação observada, os resultados se mantiveram dentro do esperado.

Na Tabela 13 estão listadas as letalidades máxima e mínima de cada corrida e os seus respectivos tempos de acúmulo até F_0 = 12 min. A razão de ter-se escolhido 12 min como referência se deve ao fato desta ser a letalidade necessária para reduzir uma população de 10^6 com valor D de 1 minuto a um SAL de 10^{-6}.

Tabela 13 – Letalidade máxima e mínima de cada corrida e o tempo de alcance até F_0 = 12 min.

		F_0 mínimo	F_0 máximo	Tempo F_0 = 12 min
Ciclo 3	Corrida 1	28,87	42,01	**21,0**
	Corrida 2	***27,67***	40,22	22,0
	Corrida 3	28,13	40,67	23,5
Ciclo 4	Corrida 1	43,85	61,22	32,5
	Corrida 2	39,92	57,89	33,0
	Corrida 3	38,1	59,88	***34,0***

O ciclo 3 apresentou a menor letalidade acumulada (27,67 minutos), mas em compensação, obteve o menor tempo de alcance a F_0 = 12 (21 minutos). A menor letalidade acumulada do ciclo 4 foi adquira na terceira corrida (38,1 minutos), mas com um tempo de alcance a F_0 = 12 de 34 minutos.

O ciclo 3, apesar de apresentar a menor letalidade, não pode ser classificado como o "pior caso", tendo em vista que o ciclo 4 apresentou maior resistência à penetração de vapor. Na figura 54 podemos verificar que o "pior caso" foi o ciclo 4, já que as curvas de suas corridas apresentaram menor inclinação que as do ciclo 3.

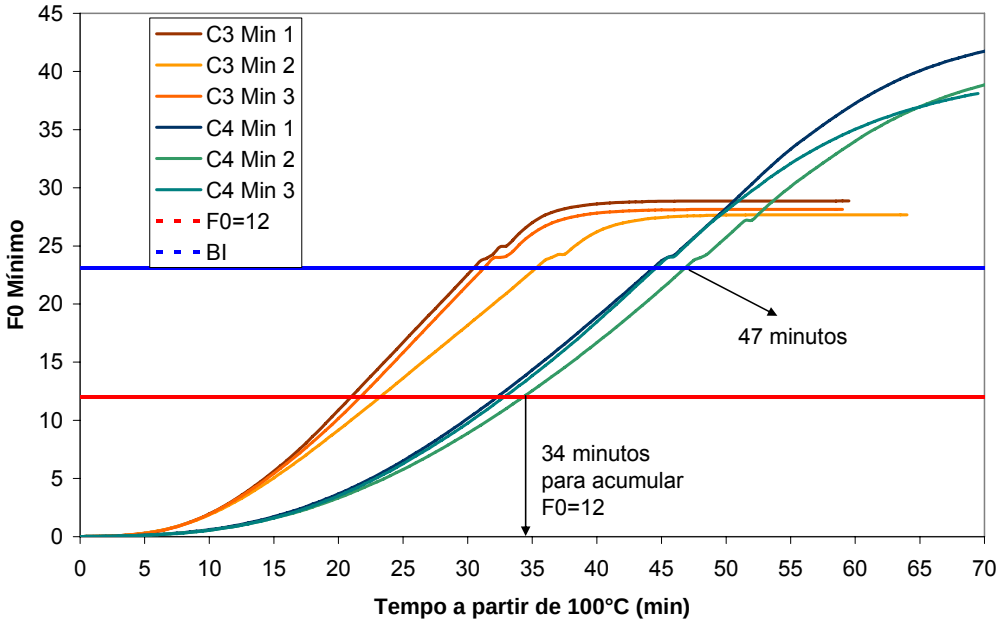

Figura 54 - Curva da letalidade mínima de cada corrida.

Em relação à eficiência energética, o ciclo 4 está superestimado, apresentando um gasto energético desnecessário. Com base na figura 54, pode-se diminuir o tempo de exposição para 47 minutos. Matematicamente, este tempo é suficiente para alcançar SAL de 10^{-6} em relação ao indicador biológico (BI).

3.3. Desafio Microbiológico

Levando-se em consideração apenas os dados físicos coletados, podemos dizer que em todos os locais ocorreram as condições mínimas necessárias à esterilização, mas, de acordo com a ISO 11134 (2001), o processo só é considerado validado se os resultados físicos e microbiológicos forem satisfatórios. Na Tabela 14 estão apresentados os resultados obtidos com os indicadores biológicos contendo o micro-organismo *Geobacillus stearothermophilus* que foram posicionados nos mesmos locais dos termopares.

Tabela 14 - Resultado do desafio microbiológico das cargas secas e líquidas.

Indicador biológico		**Tipo**	**Fabricante**	**População**	**Valor D**	**Quantidade**
Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953		Fita	CEFAR	$1,11 \times 10^6$	1,37	66

CARGA SECA		**Resultado do desafio dos pontos avaliados**											
		(C+)	**01**	**02**	**03**	**04**	**05**	**06**	**07**	**08**	**09**	**10**	**11**
Ciclo 1	***Corrida 1***	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclo 2	***Corrida 1***	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Indicador biológico		**Tipo**	**Fabricante**	**População**	**Valor D**	**Quantidade**
Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953		Ampola	MERCK	$1,50 \times 10^6$	1,90	66

CARGA LÍQUIDA		**Resultado do desafio dos pontos avaliados**											
		(C+)	**01**	**02**	**03**	**04**	**05**	**06**	**07**	**08**	**09**	**10**	**11**
Ciclo 3	***Corrida 1***	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclo 4	***Corrida 1***	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corrida 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nenhuma das corridas apresentou crescimento microbiológico nos pontos avaliados, com exceção do controle positivo (C+), nenhum indicador biológico apresentou coloração amarela após o período de incubação. O controle positivo não foi exposto ao processo de esterilização, para certificar que o lote de indicadores biológicos apresentava realmente micro-organismos vivos. Com isso, foi confirmado que, além de gerar valores de F_0 acima do requerido, os ciclos secos (1 e 2) e líquidos (3 e 4) foram capazes de inativar o micro-organismo *Geobacillus stearothermophilus.*

3.4. Planejamento Fatorial 2^3

Para avaliar o impacto da mudança no processo de esterilização por vapor, foi realizado um planejamento 2^3 com fatores posição (A), embalagem (B) e quantidade (C), com n = 3 replicações. A Tabela 15 apresenta os dados coletados de letalidade acumulada (F_0) e de índice de capacidade inferior (Cpi). O planejamento está representado graficamente na figura 55.

Tabela 15 - Resultados do Planejamento 2^3.

Ensaio		A	B	C	Letalidade			Média	Capacidade			Média
1	0	-1	-1	-1	25,21	25,14	25,34	**25,23**	5,47	5,54	5,23	**5,41**
2	(a)	1	-1	-1	25,63	23,13	26,68	**25,15**	5,73	3,83	7,09	**5,55**
3	(b)	-1	-1	1	25,2	22,75	25,59	**24,51**	5,23	3,20	5,67	**4,70**
4	(ab)	1	-1	1	26,45	26,15	26,06	**26,22**	7,13	5,76	5,03	**5,97**
5	(c)	-1	1	-1	24,63	25,77	25,36	**25,25**	2,08	7,30	7,01	**5,46**
6	(ac)	1	1	-1	22,53	26,36	25,31	**24,73**	2,08	7,30	7,01	**5,46**
7	(bc)	-1	1	1	23,73	24,38	25,01	**24,37**	4,26	6,13	7,63	**6,01**
8	(abc)	1	1	1	25,16	25,49	26,08	**25,58**	4,26	6,13	7,63	**6,01**

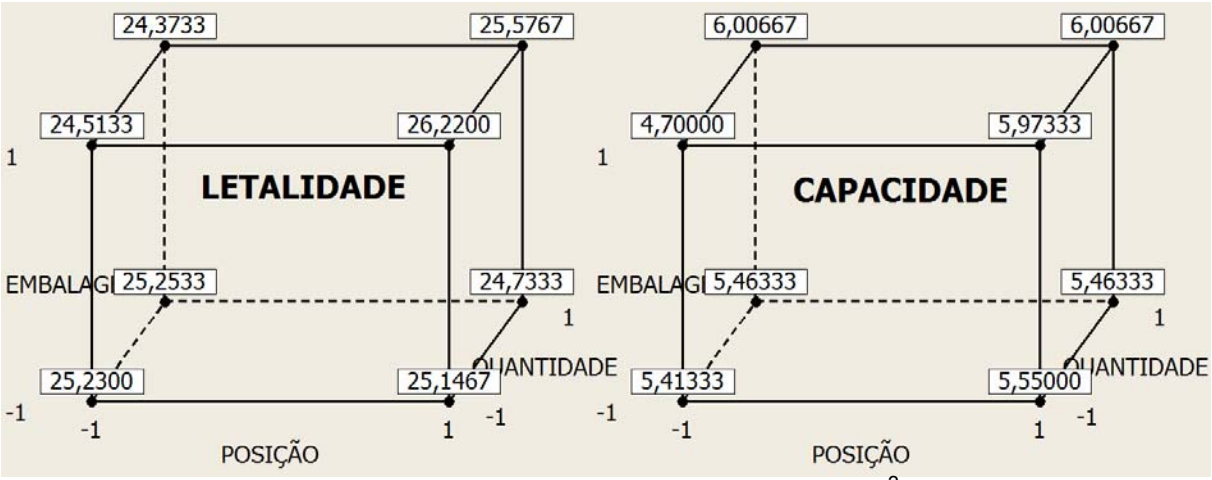

Figura 55 - Geometria do planejamento 2^3.

Com os resultados expressos na Tabela 15 e utilizando o programa STATISTICA, obtiveram-se os valores dos efeitos de cada parâmetro (posição, embalagem e quantidade) sobre a letalidade acumulada e sobre o índice de capacidade inferior durante o tempo de exposição.

Para tanto foi necessário determinar quais parâmetros realmente apresentam influência estatística significativa no nível de confiança de 95 % (α = 0,05). Os resultados podem ser observados por meio do diagrama de pareto (figura 56).

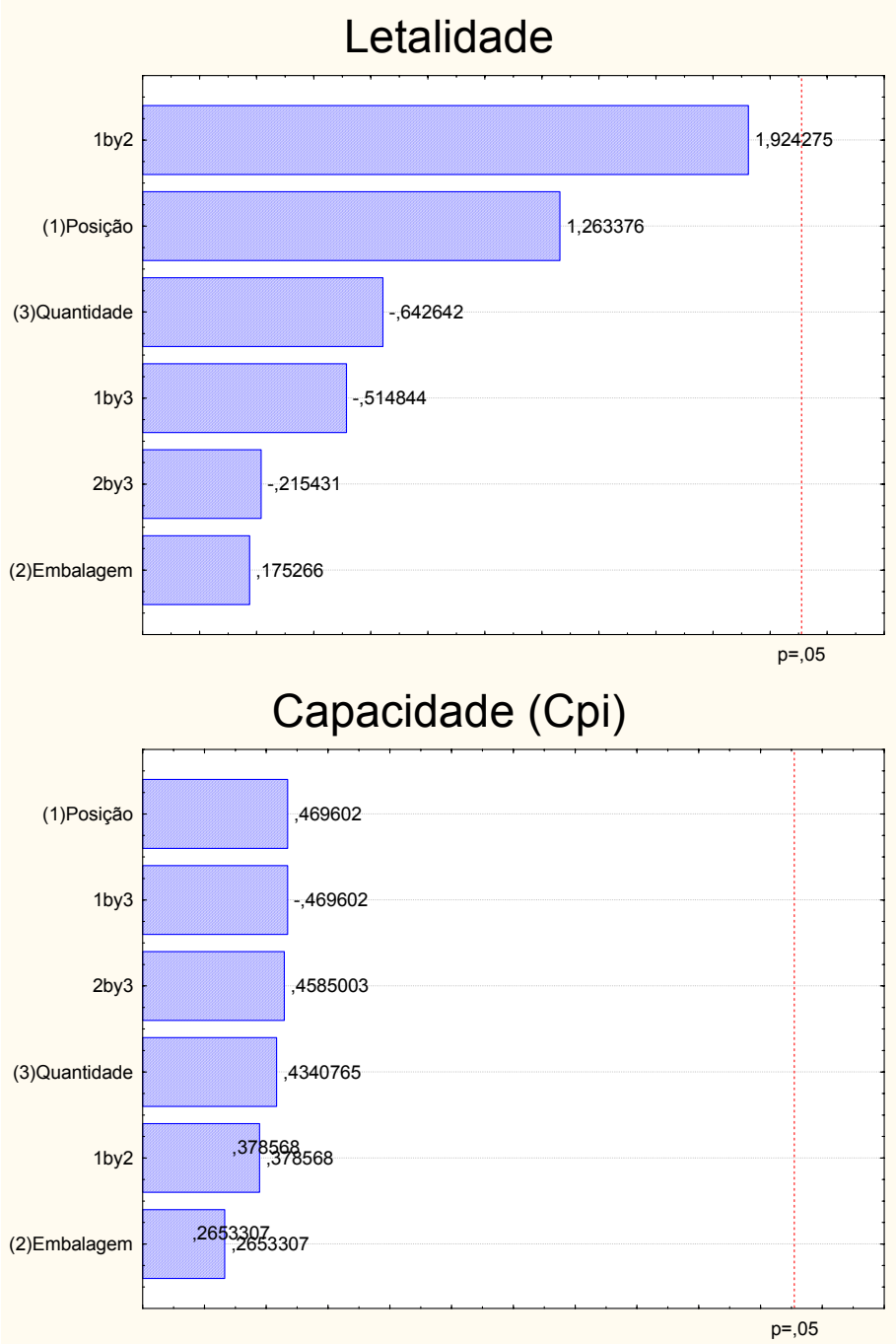

Figura 56 - Diagrama de pareto de letalidade e capacidade inferior.

Pode-se verificar que os fatores posição, embalagem e quantidade não apresentam significância estatística em nenhuma das duas respostas, pois nenhuma das barras ultrapassa a linha correspondente ao p = 0,05. A interação que mais se destacou foi a Posição x Embalagem na resposta letalidade, mas assim como as outras, também não atingiram o nível de significância arbitrado (valor P < 0,05).

A análise da variância para o planejamento fatorial completo está resumida na Tabela 16. Com base nos valores P, também é possível concluir que nenhum fator e interação apresentam significância estatística.

Tabela 16 - Tabela da Anova de Letalidade e Capacidade (α = 0,05)

Tabela da Anova - Letalidade					
Fatores	***G.L.***	***Soma Quad***	***Quadrado Médio***	***Estat. F***	***P-valor***
Posição	1	1,995	1,995	1,5023	**0,238**
Embalagem	1	0,038	0,038	0,0289	**0,867**
Quantidade	1	0,516	0,516	0,3887	**0,542**
Posição x Embalagem	1	4,629	4,629	3,4853	**0,080**
Posição x Quantidade	1	0,331	0,331	0,2495	**0,624**
Embalagem x Quantidade	1	0,058	0,058	0,0437	**0,837**
Posição x Embalagem x Quantidade	1	0,002	0,002	0,0013	**0,972**
Residual	16	21,250	1,328		
Tabela da Anova – Capacidade					
Fatores	***G.L.***	***Soma Quad***	***Quadrado Médio***	***Estat. F***	***P-valor***
Posição	1	0,746	0,746	0,209	**0,653**
Embalagem	1	0,238	0,238	0,067	**0,799**
Quantidade	1	0,637	0,637	0,179	**0,678**
Posição x Embalagem	1	0,485	0,485	0,136	**0,717**
Posição x Quantidade	1	0,746	0,746	0,209	**0,653**
Embalagem x Quantidade	1	0,711	0,711	0,200	**0,661**
Posição x Embalagem x Quantidade	1	0,485	0,485	0,136	**0,717**
Residual	16	56,988	3,562		

De acordo com este planejamento o modelo seria do tipo:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + e \quad (20)$$

Analisando-se a significância estatística de cada fator, foram obtidos os resultados mostrados na Tabela 17. Foram ignorados todos os fatores e interações que apresentaram o valor P menor que 0,05 ou que apresentaram o t calculado maior que t tabelado. Assim, nestes modelos apenas β_0 tem significância, logo o modelo seria y = 25,13 (±0,24) para letalidade e y = 5,57 (±0,39) para a capacidade inferior.

Tabela 17 - Coeficientes e efeitos da letalidade e capacidade (α = 0,10).

Coeficientes - Letalidade					
Preditor	***Efeitos***	***Estimativa***	***Desvio Padrão***	***Estat. T***	***P-valor***
Intercepto		25,13	0,24	106,831	0,000
Posição	0,577	0,29	0,24	1,226	0,238
Embalagem	0,080	0,04	0,24	0,170	0,867
Quantidade	-0,293	-0,15	0,24	-0,623	0,542
Posição:Embalagem	***0,878***	***0,44***	***0,24***	***1,867***	***0,080***
Posição:Quantidade	-0,235	-0,12	0,24	-0,499	0,624
Embalagem:Quantidade	-0,098	-0,05	0,24	-0,209	0,837
Posição:Embalagem:Quantidade	-0,017	-0,01	0,24	-0,035	0,972
Coeficientes - Capacidade					
Preditor	***Efeitos***	***Estimativa***	***Desvio Padrão***	***Estat. T***	***P-valor***
Intercepto		5,57	0,39	14,464	0,000
Posição	0,352	0,18	0,39	0,458	0,653
Embalagem	0,199	0,10	0,39	0,259	0,799
Quantidade	0,326	0,16	0,39	0,423	0,678
Posição:Embalagem	0,284	0,14	0,39	0,369	0,717
Posição:Quantidade	-0,352	-0,18	0,39	-0,458	0,653
Embalagem:Quantidade	0,344	0,17	0,39	0,447	0,661
Posição:Embalagem:Quantidade	-0,284	-0,14	0,39	-0,369	0,717

Tendo em vista a grande variabilidade na resposta, o cálculo do planejamento foi repetido, usando um nível de significância de 90% (α = 0,10). Os fatores posição, embalagem e quantidade permaneceram sem apresentar significância estatística em nenhuma das duas respostas, pois nenhum dos valores P foi menor que 0,1. Como pode ser visto na figura 57, a interação Posição x Embalagem foi o efeito mais importante na resposta letalidade, pois apresentou o valor P menor que 0,1 (0,080).

Para a resposta capacidade inferior, nada mudou no cálculo do planejamento, pois todos os fatores e interações apresentaram valores de P maiores que 0,1.

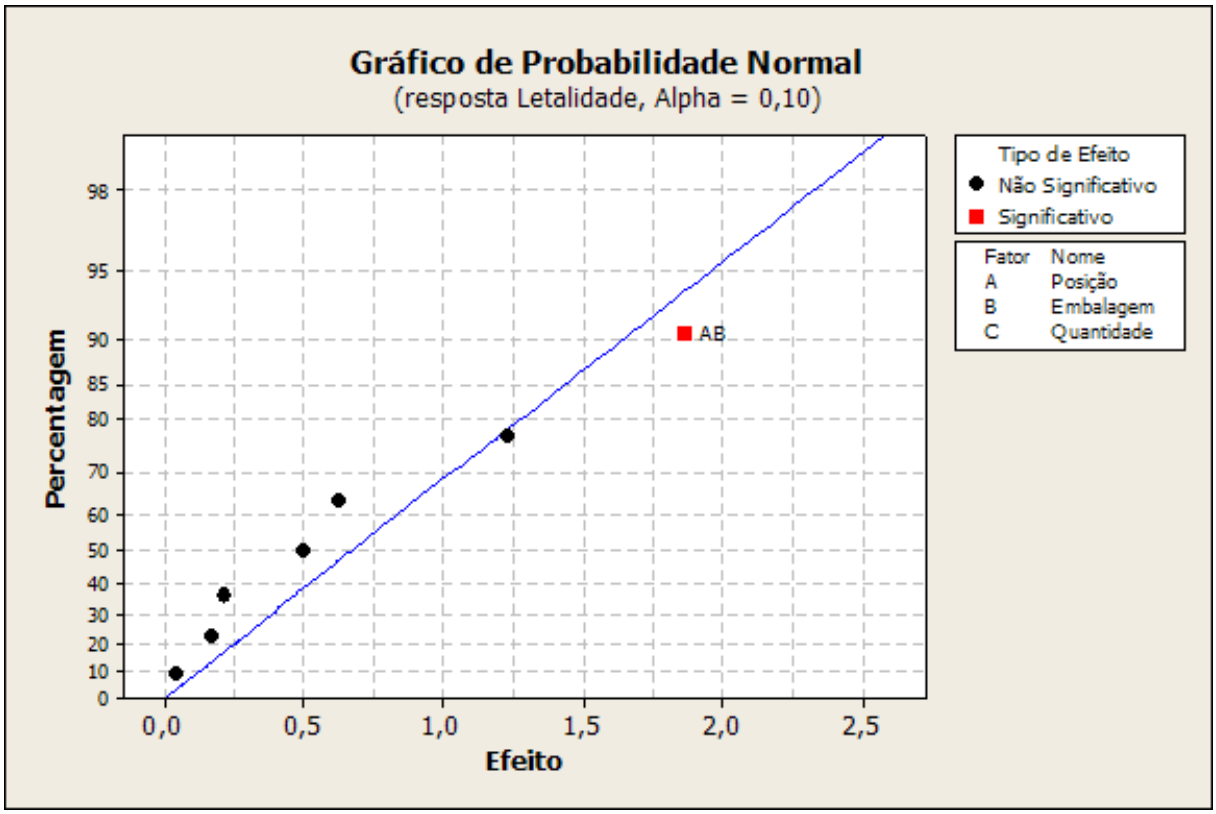

Figura 57 - Gráfico do efeito da probabilidade normal da resposta letalidade.

Foram ignorados todos os fatores e interações que apresentaram o valor P menor que 0,1. Assim, para o modelo da resposta letalidade, apenas os coeficientes β_0 e β_{12} (referente à posição x embalagem) têm significância estatística. Logo o modelo para α = 0,1 seria y = 25,13 (±0,24) + 0,44x_1x_2 (±0,24) para a resposta letalidade e y = 5,57 (±0,39) para a resposta capacidade inferior.

Estes modelos não serão aplicados para aperfeiçoar o processo de esterilização. O objetivo deles foi demonstrar estatisticamente o impacto da mudança dos fatores posição, embalagem e quantidade na esterilização. Tendo em vista que todos os fatores e interações foram ignorados, a quantidade e o posicionamento dos itens da carga podem ser alterados, contanto que sejam respeitados os espaçamentos entre os itens e que sejam adicionados apenas itens que já foram validados anteriormente. O mesmo se aplica a embalagem onde o acréscimo de uma ou duas folhas de papel grau cirúrgico na embalagem da carga, não cria barreiras que dificultam a penetração de vapor. Os poros de todas as folhas se dilatam na presença do calor, permitindo a entrada de vapor e a saída do condensado.

4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

4.1. Conclusões

Esta metodologia de validação fornece dados suficientes para avaliar o desempenho térmico da autoclave com ou sem carga. Ela traz diagnósticos mais precisos de eventuais problemas, podendo determinar se a causa esta ligada ao desgaste dos componentes da autoclave ou na montagem e configuração das cargas. Também abrange novos conceitos de seleção do “pior caso”, pois ao contrário do que muitos acreditam, nem sempre a carga máxima apresenta menor taxa de crescimento de letalidade.

Outro aspecto importante foi na revalidação. Com base na determinação do pior caso, o processo de revalidação anual consiste em realizar um estudo térmico vazio, um estudo térmico do pior caso seco e um estudo térmico do pior caso líquido. Com isto criou-se uma metodologia de revalidação rápida, segura e eficaz, destacando os pontos críticos do processo, explorando os conceitos físicos e concentrando esforços onde eram realmente necessários. Com isto foi possível atender às exigências dos órgãos regulatórios sem afetar a capacidade de produção das plantas industriais e a qualidade do processo de esterilização. Tal fato pode ser comprovado, pois esta metodologia já sofreu várias auditorias nacionais e internacionais, e nenhuma delas fez qualquer recomendação.

Os estudos de distribuição térmica para ciclos secos e líquidos, realizados com a autoclave vazia, confirmaram a homogeneidade térmica na câmara interna durante o tempo de exposição a 121°C. Isto demonstra que, no caso do ciclo seco, a bomba de vácuo e o sistema de injeção de vapor foram capazes de remover o ar e substituí-lo por vapor.

Os estudos de distribuição térmica para ciclos líquidos mostraram que o ciclo foi capaz de integrar a temperatura ao longo do tempo, acumulando letalidade suficiente para esterilizar uma carga microbiana de 10^6 endosporos de valor D_{121} de 2 minutos, a uma probabilidade de 10^{-6} (F_0 = 24 minutos).

Os ciclos de esterilização obtiveram equivalências térmicas nas fases de pré-condicionamento, tempo de exposição e pós-condicionamento nas três corridas consecutivas, confirmando a reprodutibilidade operacional, tanto nos ciclos secos, quantos nos ciclos líquidos.

Os parâmetros PID do sistema de controle de temperatura da autoclave estão bem sintonizados. A malha de controle apresentou baixo tempo de acomodação e nenhum valor de pico no período transitório. Também se mostrou bem estável durante o tempo de exposição, pois apresentou um erro estacionário médio de apenas 0,26°C e amplitude móvel média de 0,02°C. A carga não interfere no sistema de controle.

Os ciclos secos mostraram-se capazes de esterilizar suas respectivas cargas, já que todas as corridas apresentaram Cpk > 1,33. Os estudos de penetração de vapor destes ciclos confirmaram distribuição homogênea de calor, sem destacar pontos mais frios ou mais quentes.

Os ciclos líquidos também se mostraram capazes de esterilizar suas respectivas cargas, já que todas as corridas acumularam letalidade mínima maior que o especificado (F_0 = 24 minutos). O ciclo 4 está superestimado, apresentando um gasto energético desnecessário. O tempo de exposição pode ser diminuído de 60 para 47 minutos.

De acordo com os resultados do desafio microbiológico, o menor valor F_0 das cargas secas (24,52 minutos), garantiu nível de esterilidade (S.A.L.) de 18 reduções logarítmicas em relação ao indicador biológico *Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953* (Valor D de 1,37 minutos e população média de 1,10 x 10^6 endosporos por fita). Para as cargas líquidas, o menor valor F_0 (27,67 minutos), garantiu nível de esterilidade (S.A.L.) de 14 reduções logarítmicas em relação ao mesmo indicador biológico, porém com valor D de 1,90 minutos e população média de 1,50 x 10^6 endosporos por ampola. Não foi detectada a presença de endosporos sobreviventes em nenhum dos 132 indicadores biológicos utilizados. Este nível de segurança de esterilidade é maior que o estabelecido pelos critérios de aceitação que é de 12 reduções logarítmicas.

Tendo em vista que as medições térmicas e os testes microbiológicos foram satisfatórios nas três corridas consecutivas, pode-se concluir que as cargas com os seus respectivos ciclos estão validadas e prontas para serem utilizadas na rotina de produção.

O planejamento experimental constatou que, para o nível de significância de 95% , as mudanças nos fatores posição, embalagem e quantidade da carga não são significativas para o processo de esterilização, em autoclave com remoção forçada de ar, desde que sejam respeitados os espaçamentos entre os itens, para que o

vapor transite livremente. Já para o nível de significância de 90%, a interação Posição x Embalagem apresentou significância estatística no processo de esterilização.

Ao contrário que se pensa, o acréscimo de uma ou duas folhas de papel grau cirúrgico na embalagem da carga, não cria barreiras que dificultam a penetração de vapor. Os poros de todas as folhas se dilatam na presença do calor, permitindo a entrada de vapor e a saída do condensado.

A quantidade e o posicionamento dos itens da carga podem ser alterados, contanto que sejam respeitados os espaçamentos entre os itens e que sejam adicionados apenas itens que já foram validados anteriormente.

4.2. Sugestões para outras Indústrias

Concentrar esforços na fase de especificação da autoclave, envolvendo a equipe de produção, engenharia e garantia da qualidade. Qualquer tempo e recurso gasto nesta fase do projeto, certamente serão menores que na fase de instalação e operação. Uma autoclave bem especificada é importantíssima para o sucesso da validação.

Utilizar o Índice de Capacidade de Processo (Cpk) para avaliar o desempenho térmico de outros equipamentos, como por exemplo, estufas, fornos, freezers, refrigeradores e câmaras frigoríficas.

Utilizar a Curva da Letalidade Mínima para determinar o “pior caso” em processo de despirogenização por calor seco em fornos.

Utilizar sempre que possível, o Método de Sobremorte (*Overkill*) nos processos de esterilização por vapor. Entre os três métodos, é o que apresenta maior margem de segurança.

Calibrar semestralmente as malhas de temperatura e pressão da autoclave de forma a garantir a manutenção do status de validação.

Classificar as cargas em secas e líquidas antes de iniciar a validação. Isto impede que determinados itens sejam esterilizados de forma ineficiente, ocasionando perda de volume em cargas líquidas ou ausência de vapor nos poros das cargas secas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALLOCO, J. P. Understanding Overkill Sterilization: An End to the Confusion. *Pharmaceutical Technology*, 2007.

AGALLOCO, J.; AKERS, J.; MADSEN, R. *Moist heat sterilization – myths and realities,* 2009.

AGALLOCO, J.; CARLETON, F. *Validation of Pharmaceutical Processes*. 3. ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

ALONSO, I. M. T. Controle Estatístico de Processo: o caso da produção da Vacina contra *Hæmophilus influenzæ* tipo B – Hib. 2005. Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ANVISA . Portaria n. 500/MS/SNVS, de 9 de outubro de 1997

ANVISA, RDC n. 210, Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, 2003.

ANVISA. *Guias relacionados à garantia de qualidade*. Brasília: ANVISA, 2006.

ANVISA. *Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 11134, Esterilização de produtos hospitalares - Requisitos para validação e controle de rotina - Esterilização por calor úmido, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 11139, Esterilização de produtos de atenção à saúde — Vocabulário, 2009.

BALESTRASSI P. P. Identificação de padrões em gráficos de Controle Estatístico de Processos, em tempo real, utilizando séries temporais e redes neurais artificiais. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

BAUMER, *Conceitos Básicos de Desinfecção, Esterilização e Qualificação*. São Paulo: BAUMER, 2004.

BERTO, M. I.; VITALI, A. A. Controle em tempo real em um processo de esterilização convencional. *Brazilian journal of food technology*, 2008.

BOCA, B. M.; PRETORIUS, E.; GOCHIN, R.; CHAPOULLIE, R. An Overview of the Validation Approach for Moist Heat Sterilization, Part I. *Pharmaceutical Technology*, 2002.

CHOW, S. *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics.* 2.ed. USA: Informa Healthcare, 2003.

CLEMENT, L.; BLILEY, J. Understanding Steam Sterilizer Physical Parameters. *Infection Control Today*, 2004.

CLONTZ, L. *Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation Approaches and Global Requirements.* 2. ed. New York: CRC, 2009.

DENYER, S. P.; HODGES, N. A.; GORMAN, S. P. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology.* USA: Blackwell Science, 7th edition, 2004.

DOORNMALEN, J. P. C. M.; KOPINGA, K. Temperature dependence of F-, D- and z-values used in steam sterilization processes. *Journal of Applied Microbiology,* 2009.

EDQM, *European Pharmacopoeia* (Farmacopéia Européia) 5. ed. 2005

EU GMP. Guide Sterile Annex 1 Manufacture of sterile medicinal products, 2002.

FDA. *Guidance for industry for the submission documentation for sterilization process validation in applications for human and veterinary drug products.* 1994.

FDA. Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice. 2004.

FDA. *Guideline on General Principles of Process Validation*. 1987.

FEEHERRY, F. E.; MUNSEY, D. T.; ROWLEY, D.B. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and environmental microbiology*, 1987.

FILHO, G. C. S; PENNA, T. C. Validação do processamento térmico de um produto protéico vegetal enlatado. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas,* 2003.

FONTANA, R.T. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 2006

FRAISE, A. P.; LAMBERT, P.A. MAILLARD, J. *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization.* USA: Blackweel, 2004.

GAMP Forum Steering Committee, The Good Automated Manufacturing Practice, ISPE, 5th Ed., (2008)

GAYARD, Y. L. M. Gerenciamento de Risco para Autoclaves. *SBCC*, 2009.

GONÇALEZ, F. H. F. S. Validação dos processos envolvidos no cultivo da bactéria *Hæmophilus influenzæ* tipo B para produção de vacina. 2007. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GONÇALEZ, P. U.; WERNER, L. Comparação dos índices de capacidade do processo para distribuições não-normais. *Gest. Prod.*, 2009.

GOULD, G. W. History of science - spores. *Journal of applied microbiology*, 2005.

HABERER, K.; VREDEN, K. A Risk-Based Approach to the Use of Biological Indicators in the Development and Control of Steam-Sterilization Processes. *Pharmaceutical Technology*, 2007.

HALLS, N.A. *Achieving sterility in medical and pharmaceutical products*. New York: Marcel Dekker, 1994.

HAS (Health Sciences Authority). *Regulatory guidance: Validation of terminal moist heat sterilization.* HAS, 2008.

HEALTH CANADA. *Guide process validation: moist heat sterilization for pharmaceuticals*. 2001.

HICPAC. *Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities*. 2008.

HTM 2010 - *Health Technical Memorandum 2010*. Londres, 1994.

KOWALSKI, T. *Calibration in the Pharmaceutical Laboratory.* New York: CRC, 2001.

KUMADA, K.; KOIKE K.; FUJIWARA K. The survival of bacteria under starvation conditions: a mathematical expression of microbial death. *Journal of general microbiology*, 1985.

LABBE, R. G. Recovery of spores of *Bacillus stearothermophilus* from thermal injury. *Journal of applied bacteriology*, 1979.

LESSA, M. L. *Sistema para Avaliação Metrológica de Autoclaves*. 2008. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. *Microbiologia Médica e Imunologia* 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEWIS, G. A.; MATHIEU, D.; PHAN-TAN-LUU, R. *Pharmaceutical Experimental Design*. New York: Marcel Dekker, 1999.

LEWIS, R. G. Practical guide to autoclave validation. *Pharmaceutical engineering*, 2005.

LIMA, A.A.N.; LIMA, J.R.; SILVA, J.L.; ALENCAR, J.R.B.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; LIMA, L.G.; ROLIM-NETO, P.J. Aplicação do controle estatístico de processo na indústria farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas,* 2006.

LUQUETA, G. R. Princípio da esterilização por calor úmido - Como funciona uma autoclave. *Controle de contaminação*, 2008.

LUQUETA, G. R.; Esterilização por calor e a cinética de morte microbiana. *BAUMER*, 2004.

MCKEE, S.; GOULD, G. W. A simple mathematical model of the thermal death of microorganisms. *Bulletin of mathematical biology*, 1988.

MEIER, F. A.; MEIER, C. A. *Instrumentation and control systems documentation.* USA: ISA, 2004.

MOESBY, L.; HANSEN, E. H.; CHRISTENSEN, J. D.; Dry and moist heat sterilization cannot inactivate pyrogenicity of gram positive microorganisms. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2005.

MOLIN, G.Inactivation of Bacillus spores in dry systems at low and high temperatures. *Journal of general microbiology*, 1977.

MONTGOMERY, D. C., *Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade. 4. ed.* RJ: LTC, 2004.

MSPC Informações técnicas. Disponível em: <http://www.mspc.eng.br/termo/termod0310.shtml>. Acesso em: 18 de setembro, 2010.

OCIO, M. J.; FERNANDEZ, P. S.; ALVARRUIZ, A.; MARTINEZ, A. Comparison of TDT and Arrhenius models for rate constant inactivation predictions of *Bacillus stearothermophilus* heated in mushroom-alginate substrate. *Letters in applied microbiology*, 1994.

ODUM, J. Sterile product facility design and project management. New York: CRC, 2004.

OMS. *A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements Part 2: Validation*. Geneva, 1997.

PDA. *Technical report #1: Moist heat sterilization in autoclaves: cycle development, validation and routine operation.* 2000.

PENNA, A. Jr. *Apresentação sobre qualificação de autoclaves,* São Paulo: Instituto Racine, 2006.

PENNA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. A. Esterilização térmica. Conceitos Básicos da Cinética de Morte Microbiana. *Revista de farmácia bioquímica da universidade de São Paulo*, 1997.

RAHN, O. Physical methods of sterilization of microorganisms. *Bacteriological reviews*, 1945.

RAPOPORT, E.; PLESHIVTSEVA, Y. *Optimal control of induction heating processes.* New York: CRC, 2006.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. *Pharmaceutical Microbiology* 7. ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G. A. J. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* 4.ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2004.

SCHAECHTER, M. *Encyclopedia of microbiology*. USA: Elsevier, 2009.

SICSÚ, Laredo. Entrevista concedida a revista SUPERINTERESSANTE edição nº 271, ano 23, n. 11, São Paulo, novembro 2009.

SILVA, C. R. Utilização da ferramenta estatística *doe – design of experiments* (desenho do experimento) na validação de processos críticos da Indústria Farmacêutica. 2007. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

STROHL, W. A. *Microbiologia Ilustrada* 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Technical Information Report: *Principles of industrial moist heat sterilization*. AAMI, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

USP. *United States Pharmacopeia (*Farmacopéia Americana*). XXXII ed.* 2009.

VIEIRA, P. 6 razões para acreditar que estatística é a profissão do futuro. SuperInteressante , novembro 2009.

VOORSPOELS, J.; REMON, J. P.; NELIS, H.; VANDENBOSSCHE, G. Validation of filter sterilization in autoclaves. *International journal of pharmaceutics*, 1996.

ANEXO A - Especificação de Projeto de uma Autoclave

A especificação de projeto é fundamental para a autoclave e para o bom relacionamento entre usuário e fornecedor. As novas autoclaves horizontais são complexas, caras e pode ser impraticável qualquer mudança após a compra. Com isto, é muito importante definir as funções e as finalidades da autoclave antes da construção.

A especificação do projeto deve ser elaborada antes da compra de uma autoclave, pois este documento é importante para determinar o que será necessário para o sistema de esterilização. A sua elaboração é uma tarefa multidisciplinar que deve envolver as equipes de engenharia, produção, validação e garantia da qualidade.

Os objetivos atuais e as tendências do produto no mercado mundial têm impacto significativo sobre os requisitos de processo. Também pode ser difícil usar uma autoclave para satisfazer todos os requisitos. A especificação de projeto deve incluir os valores das utilidades disponíveis na fábrica necessárias para operação da autoclave, tais como vapor, água, ar comprimido e energia elétrica. Ela define marcos importante, como as datas de entrega, revisão dos parâmetros de controle, testes de aceitação de fábrica (FAT), data de embarque, duração do comissionamento, a quantidade de testes de aceitação no local (SAT), treinamento e documento. Quando todos os critérios são estabelecidos, as especificações são aprovadas por todos da equipe multidisciplinar e apresentadas aos fornecedores.

Uma Especificação de Requerimento do Usuário (ERU) e uma Descrição Funcional (DF) são os documentos necessários para atingir estes objetivos. Existem muitas razões para gerar estes tipos de documentos:

- A DF fornece fundamentos para elaboração dos documentos de qualificação operacional.
- A ERU fornece fundamentos para elaboração dos documentos de qualificação de performance.
- A qualificação de projeto engloba os documentos exigidos pelos órgãos regulatórios.
- A geração destes documentos obriga os engenheiros de projeto a detalhar por escrito todo escopo do projeto em documentos que são

encaminhados ou aprovados para compra, permitindo tratar eventuais irregularidades antes da finalização do pedido.

- Todos os departamentos da indústria farmacêutica participam no processo de decisão eliminando certos tipos de comentários como “Eu não fui consultado”, "Eu teria feito isso de forma diferente" ou “Não foi esta autoclave que eu pedi”.
- Tanto o usuário como o fornecedor da autoclave têm melhor entendimento das expectativas de ambas às partes, minimizando muitas surpresas que podem ocorrer durante a instalação e qualificação.

A1. Especificação de Requerimento do Usuário (ERU)

Segundo a *Good Automated Manufacturing Practice* - GAMP (2008), este documento, elaborado pelo usuário, define as funções requeridas e esperadas pelo usuário final da autoclave (*o que fazer*) sem pré-determinar soluções.

Ele deve conter:

- O tamanho máximo da autoclave, especificando as demissões disponíveis na fabrica.
- O tamanho da câmara interna
- Os tipos de carga a serem esterilizados conforme seu **objetivo final** e **fase da matéria**.
- Descrição dos itens das cargas (por exemplo, frascos de vidro ou ampolas, produtos plásticos, rolhas, vestimentas e densidade das cargas líquidas).
- Exigências dos órgãos regulatórios.
- Detalhamento dos pontos de amostragem de água, vapor e ar comprimido.
- Documentação de manutenção, operação e qualificação (protocolos de QI, QO)
- Faixa térmica de trabalho (por exemplo, 115 a 134°C)

- O número de esterilizações diárias para definir a duração das fases de pré e pós-condicionamento (por exemplo, acelerar o resfriamento da carga para obter mais corridas por dia).
- Descrição de requerimento de construção da câmara e periféricos (por exemplo, câmara interna deve ser construída de acordo com os requisitos da *American Society of Mechanical Engineers* - ASME em aço 316L);
- Fluxo de material para definir se é uma autoclave de uma ou duas portas.
- Lógica de intertravamentos e alarmes (por exemplo, a porta do lado limpo só pode ser aberta se o ciclo estiver finalizado; alarme de falta de vapor ou ar comprimido)
- Especificação do sistema de filtração (por exemplo, um filtro de retenção microbiana deve ser instalado, com esterilização *in situ* durante o ciclo)
- Especificação do sistema de controle. Geralmente as indústrias padronizam os componentes e periféricos em suas instalações para facilitar o gerenciamento de peças sobressalentes e reduzir os custos de validação. Fabricantes e modelos de preferência devem ser especificados.
- O formato da carta gráfica que deve conter o nome do ciclo, o número da corrida, o nome do operador, os parâmetros do ciclo, a data/hora de inicio e fim da corrida, o código da autoclave, a curva térmica e os alarmes, caso ocorram.

Os sensores de temperatura normalmente utilizados no dreno e interior da câmara são as termorresistências PT100. Eles são escolhidos devido a sua alta precisão e ampla faixa de temperatura. A fim de garantir a qualidade do produto, deve existir um sensor de controle independente da malha de controle. Isto faz que qualquer possível falha no sensor de controle seja detectada pelo sensor independente (ISO11134, 2004).

Autoclaves com controlador do tipo PID (proporcional, integral e derivativo) apresentam maior precisão na temperatura de exposição (±0,5°C) e baixo valor de

pico no início da exposição. O controle preciso é necessário para aqueles ciclos que exigem uniformidade térmica ou para cargas com itens que são sensíveis ao calor.

A fim de atingir a confiabilidade a um menor custo, o controle do processo deve ser feito por CLP (Controlador Lógico Programável) conectado a um sistema supervisório. Isto faz com que alarmes, dados e parâmetros do ciclo sejam armazenados para obter rastreabilidade no processo de produção.

As definições de alarmes são importantes para o sucesso de esterilização. O sistema de controle deve reconhecer situações que estão fora dos parâmetros de funcionamento. O operador deverá ser notificado por meio de alarme visual ou sonoro. Alarmes podem ser programados para interromper, conter (modo espera), ou abortar ciclos que estejam fora dos limites estabelecidos. Os tipos de alarmes mais utilizados são:

- Tempo de exposição longo ou curto
- Temperatura alta ou baixa
- Pressão alta ou baixa
- Mau funcionamento da válvula
- Falta de vapor, ar comprimido e água
- Falha na bomba de vácuo
- Falta de energia
- Falha na porta

Se um alarme não for especificado antes da construção da autoclave, dificilmente estará presente no momento da aquisição.

Uma vez aprovada, a ERU deve ser entregue para o fornecedor da autoclave para elaborar a Descrição Funcional. Durante e depois da qualificação toda mudança deve ser controlada e documentada conforme os procedimentos pré-estabelecidos.

A2. Descrição Funcional

A Descrição Funcional (DF) é elaborada pelo fornecedor da autoclave e descreve as funções detalhadas do equipamento (*como fazer)*. Uma versão inicial da DF pode ser produzida como proposta do fornecedor. Revisões adicionais da DF

são preparadas junto com o usuário obrigatório (GAMP, 2008). A DF é relacionada com a Qualificação de Operação, a qual testa todas as funções especificadas.

A DF deve cobrir os aspectos físicos e funcionais de cada requisito da ERU e identificar qualquer não conformidade. Ela é base para o desenvolvimento da especificação do projeto e fornece os critérios de aceitação dos testes de qualificação. Qualquer diferença entre a especificação de projeto e a DF deve ser claramente identificada pelo fornecedor, revisada e acertada com o usuário.

Os cruzamentos dos requisitos da ERU com as soluções da DF devem ser feitos através da Matriz de Rastreabilidade, exemplificada na Tabela 18.

Tabela 18 - Matriz de Rastreabilidade

Número de referência da ERU	Descrição	Referência da Descrição Funcional	Observação
1.0	Texto...	DF02 3.1.4 (a)	
2.0	Texto...	DF33 1.3.2	
2.1.1	Texto...	DF33 1.3.3	
2.1.2	Texto...	DF33 1.2.2	

ANEXO B - Teste de Aceitação de Fabrica – FAT

O teste de aceitação em fábrica (do inglês, *factory acceptance test - FAT*) é uma série de testes ou desafios que são executados nas instalações do fornecedor da autoclave, com a supervisão do usuário (GAMP, 2008). Ele segue uma seqüência de teste descrita em um documento formal chamado de Protocolo de FAT. A intenção é verificar se as especificações de projeto da autoclave foram cumpridas. As funcionalidades são testadas nas instalações do fornecedor para detectar alguma não conformidade ainda na fábrica. Isto é importante, pois é possível realizar uma correção imediata, antes que a autoclave seja enviada para o usuário. Em muitos casos, pode não ser possível a realização de todos os testes, como por exemplo, testes de integração com as utilidades (ar comprimido, água e vapor). No entanto, o fornecedor pode se aproximar do cenário de produção do usuário final, através de simulações. O ideal é que o FAT seja concluído satisfatoriamente, mas nada impede que algumas não conformidades sejam documentadas no protocolo de FAT e corrigidas após o envio ao usuário, desde que o fornecedor se comprometa a corrigi-las.

A fiação do sistema automatizado da autoclave é verificada totalmente durante o FAT. O mesmo acontece com os alarmes especificados na ERU. Outro teste comum é a utilização de um simulador de processo, que envia sinais elétricos (analógicos e digitais) para os cartões de entrada do CLP (Controlador Lógico Programável), para verificar os acionamentos das válvulas de controle. Uma analise da programação do software da autoclave deve ser realizada no FAT.

Deve ficar acordado com o fornecedor da autoclave que o protocolo de FAT deve ser previamente encaminhado ao usuário para aprovação.

Durante o FAT deve-se avaliar as seguintes questões:

- Existem restrições de tamanho para a câmara da autoclave ou painel de controle?
- Existem restrições de espaço para abertura e fechamento das portas?
- Todos os modos alarmes serão testados no fornecedor? Se não, poderão ser testados no usuário?
- Os diagramas são adequados para verificar a instrumentação, tubulação, fiação e lógica de programação?

- Qual a política de controle de mudança do fornecedor?
- O fornecedor tem um roteiro de teste que descreve os procedimentos associados com os resultados esperados?
- Todas as mensagens de erro do software serão testadas?
- Quais peças sobressalentes são necessárias? Fabricantes genéricos são compatíveis?
- Os testes serão suficientes para garantir que a autoclave opere conforme o esperado?
- Qual o suporte do fornecedor durante a instalação da autoclave nas instalações do usuário? Material de treinamento de manutenção e operação?

Um FAT pode fornecer excelentes benefícios financeiros tanto para o usuário quanto para o fornecedor, se a autoclave foi muito bem especificada. O FAT é o momento ideal para atualização das especificações. Se, no entanto, o projeto não foi bem especificado ou mal executado, é uma boa hora para determinar o que é realmente necessário. Após a autoclave ser enviada ao local do usuário final, torna-se dispendioso e demorado tentar alterar o projeto, sendo em alguns casos impossível.

ANEXO C - Qualificação de Instalação – QI

A qualificação de instalação de uma autoclave é realizada no local do usuário e é composta por várias etapas.

C1. Comissionamento

Comissionamento são atividades realizadas depois que a autoclave é conectada eletricamente e mecanicamente no local de trabalho. A equipe de instalação executa ciclos para testar a autoclave. Nesta fase, nada é documentado, pois são apenas testes operacionais (ensaios). A execução de ciclos de esterilização é atividade fundamental na pré-qualificação, pois destaca falhas grosseiras no processo de instalação, como por exemplo, vazamentos nas conexões. Os testes realizados durante o comissionamento verificam se as bombas de vácuo, válvulas e funções de controle operam corretamente. Geralmente, é nesta fase que começa a elaboração dos procedimentos de operação, calibração e manutenção.

C2. Teste de Aceitação no Local – SAT

O Teste de Aceitação no Local (do inglês, *Site Acceptance Testing* - SAT) é composto de uma série de testes executados junto com o fornecedor nas instalações do usuário. Normalmente o SAT constitui a repetição do FAT no ambiente de operação do usuário, mas agora interagindo com todo o processo, instrumentação de campo, interfaces e utilidades (GAMP, 2008).

O objetivo destes testes é verificar se não houve danos à autoclave durante o transporte e, principalmente, se todas as não-conformidades encontradas no FAT foram corrigidas. Normalmente, o usuário final requer a conclusão bem-sucedida do SAT antes concretizar o pagamento ao fornecedor.

Uma das vantagens de se realizar o SAT é a realização de parte da qualificação e treinamentos da autoclave junto com o fornecedor.

C3. Testes de QI

Os testes de QI são realizados para garantir que a autoclave foi instalada de acordo com as especificações do fornecedor e do usuário. Nesta fase começa a documentação dos testes. A verificação da instalação de item por item é realizada como parte do teste. A documentação fornecida com o equipamento e os dados coletados durante os testes são úteis aos inventários de peças de reposição, procedimentos de manutenção preventiva e programação das freqüências de calibrações.

Protocolos de QI normalmente incluem os seguintes tipos de informações:

- Introdução: uma explicação muito básica, mas completa da autoclave. Ela inclui os equipamentos auxiliares e as características físicas.
- Diagramas Esquemáticos: são desenhos de engenharia, como diagramas elétricos, de tubulação, de instrumentação, de montagem e dimensionais. Parte do teste inclui verificar tais desenhos com a instalação física.
- Registros de dados de teste: folhas de assinaturas devem ser incluídas para demonstrar que foram feitas verificações dos itens instalados corretamente. Cada verificação deve conter uma rubrica do instalador.
- Lista de componentes: esta lista deve conter informações tais como fabricante, modelo, nº. de serie, capacidade ou tamanho e material de construção para cada componente crítico.
- Lista de instrumentação: esta lista deve conter informações tais como fabricante, modelo, nº. de série, escala, menor divisão e faixa de trabalho.
- Certificados de calibração: uma tabela deve ser incluída para verificar a calibração dos instrumentos críticos. Os certificados devem ser mantidos disponíveis para revisão.
- Lista de fabricantes dos componentes: são catálogos de componentes, manuais de operação e manutenção, lista de peças e documentação de software.

- Lista de utilidade: são listas que incluem dados de suplementos necessários para operação, tais como pressão mínima de vapor puro, água e ar comprimido.

Documentos de comissionamento, SAT e QI são referências técnicas fundamentais para o ciclo de vida da autoclave. Eles fornecem informações imprescindíveis para os departamentos de manutenção, engenharia e validação para avaliarem o impacto das futuras alterações ao longo da vida da autoclave.

ANEXO D - Qualificação de Operação – QO

A Qualificação de Operação acontece após o QI e é realizada com a autoclave energizada, mas sem carregamento de produto na câmara interna. São testes que verificam as etapas dos ciclos de esterilização, a homogeneidade térmica da câmara, os eventos de erros ou falhas, a automação dos comandos e os registros e armazenamentos de dados. O objetivo é verificar se a autoclave opera de acordo com as Descrições Funcionais (DF). A verificação inclui testes operacionais e corridas de ciclos de esterilização. Estas corridas são realizadas com a câmara da autoclave vazia (sem carga) sendo chamado de Estudos de Vazio da Autoclave. A distribuição térmica da autoclave sem carga é primordial para avaliar o desempenho da autoclave. A avaliação da homogeneidade térmica da carga depende de como a autoclave será utilizada, uma vez que o posicionamento dos itens da carga pode dificultar o transito do vapor. Caso contrário, seria difícil determinar quem é o culpado pela reprovação nos teste de qualificação, a carga ou a autoclave.

Uma ou mais autoclaves, com projetos idênticos, pode estabelecer equivalência operacionais para reduzir a quantidade de testes necessários (ISO11134, 2004). Os requisitos para determinar a equivalência entre as autoclaves são que elas sejam idênticas e que passem pelo processo de Qualificação de Instalação. Todas as autoclaves devem ser inicialmente qualificadas para certificar que foram cumpridos os requisitos de testes de QI e QO, que estabelecem os critérios de aceitação e provam a equivalência dos parâmetros operacionais entre elas.

D1. Estudo Térmico Vazio

O estudo térmico da autoclave fornece a distribuição térmica na câmara interna destacando os pontos quentes e frios. A distribuição térmica pode ser influenciada pelo modelo, tamanho e projeto da autoclave. Geralmente são executados com três corridas consecutivas para demonstrar a reprodutibilidade do sistema. Cada tipo de ciclo (seco, líquido e descontaminação), por apresentar particularidades distintas, é testado separadamente. Os sensores são espalhados equidistantemente na câmara interna, conforme a figura 58. São definidos os limites máximo e mínimo e o limite de variação entre os sensores (sensor máximo menos o

sensor mínimo) apenas no período de tempo de exposição. Durante o estudo é posicionado um sensor adjacente aos de controle. O sensor de controle para cargas secas é o PT100 de dreno e para cargas liquidas é o PT100 de carga. O número de sensores de temperatura utilizados no estudo pode variar conforme o tamanho da câmara, mas a maioria das indústrias farmacêuticas padronizou doze sensores.

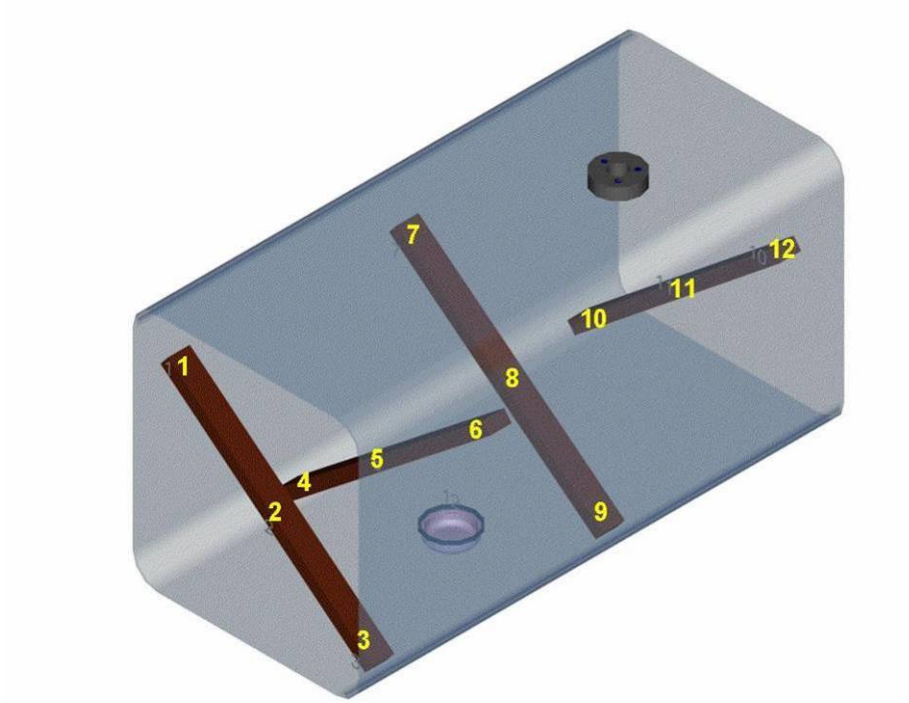

Figura 58 - Distribuição dos sensores de temperatura no interior da autoclave para a realização do estudo térmico vazio.

A utilização de grande número de sensores pode afetar a estanqueidade da câmara, já que todos sensores passam no mesmo orifício da autoclave, chamado porta de validação. Hoje este problema esta sendo solucionado com *data loggers* com tecnologia *wireless*, mas infelizmente ainda é muito caro. Uma vez que a distribuição do vapor está sendo avaliada neste estudo, é importante que os sensores não entrem em contato com a superfície da parede interna da câmara, pois isto acarretaria em falsas medições.

Quando a autoclave for utilizada para métodos sobremorte em cargas termoestáveis é aceitável uma variação de ±2°C entre os sensores de temperatura durante o tempo de exposição. Uma variação superior a ±2°C não causa impacto na esterilização, já que o ciclo é dimensionado de acordo com o menor valor de letalidade acumulada, mas indica um mau funcionamento da autoclave. A presença de ar na câmara pode causar grande variação de temperatura.

Para cargas que não são termoestáveis os critérios são mais estreitos (±1°C). Este critério deve ser claramente definido na ERU. Neste caso, quando uma autoclave apresenta variação maior que ±1°C, é considerada inapropriada para cargas sensíveis ao calor, pois resultará em variações grandes de letalidade acumulada. Isto pode ser observado na Tabela 19, onde a variação de ±1°C em 15 minutos pode causar variação de letalidade de aproximadamente 7 minutos (7 F_0).

Tabela 19 - Efeito de uma variação ±1°C na letalidade acumulada

Tempo	-T	-Fo	T	Fo	+T	+Fo
1 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
2 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
3 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
4 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
5 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
6 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
7 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
8 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
9 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
10 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
11 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
12 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
13 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
14 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
15 min	120°C	0,794	121°C	1	122°C	1,259
Letalidade Acumulada		**11,91**		**15,00**		**18,88**
Variação da Letalidade Acumulada				*15±6,97 min*		

D2. Teste nos Filtros da Autoclave

A QO deve testar o processo de esterilização do filtro de efluentes e a sua integridade física. A esterilização do filtro pode ser confirmada com a inoculação de indicadores biológicos na membrana dos filtros. O teste de integridade do filtro é usado para avaliar a integridade das membranas depois de vários ciclos de esterilização e pode ser investigado por qualquer método convencional de teste de integridade. A vida do filtro pode ser deduzida empiricamente conforme a experiência do fabricante.

Um outro filtro que deve ser testado periodicamente é o filtro de aeração, pois ele é responsável pela admissão de ar durante a fase de secagem (pós-

condicionamento). Qualquer ar contaminado que entre após o tempo de exposição, compromete a capacidade de esterilização da autoclave.

D3. Requisitos para a Qualificação de Operação

Antes a realização dos testes de QO é fundamental que:

- A qualificação de instalação seja concluída.
- Todos os instrumentos críticos da autoclave estejam calibrados.
- Os procedimentos operacionais padrão (POP) estejam elaborados.
- O controle de mudança esteja implementado.
- Os operadores da produção estejam treinados.
- A equipe da qualidade seja treinada em verificar os parâmetros de controle.
- Os procedimentos de manutenção preventiva estejam aprovados.
- A documentação técnica da autoclave (manuais de operação, desenhos de engenharia) seja arquivada.

ANEXO E - Qualificação de Performance – QP

A Qualificação de Performance (QP) são testes com objetivo de documentar que a autoclave é capaz de desempenhar, de forma consistente e confiável no seu local de trabalho, as atividades de processos previstas na ERU. Nesta fase ocorre a transição de **qualificação do equipamento** para a **validação do processo** de esterilização

Antes de iniciar o processo de QP, deve-se: concluir com sucesso as qualificações de instalação e operação (QI&QO), determinar o método de esterilização, selecionar os indicadores biológicos e definir as montagens das cargas. Com relação à carga, é importante conhecer a composição dos seus itens para dimensionar ciclos com base em suas limitações térmicas.

E1. Plano de Ação para execução de QP

Para padronizar as exigências de QP, é fundamental que se estabeleça um plano de ação em parceria com os departamentos de garantia da qualidade e produção para determinar a melhor estratégia que atenda tanto os interesses financeiros da empresa, como as exigências dos órgãos reguladores. Devem-se responder os seguintes questionamentos:

- Todas as quantidades de volume e tamanhos de recipientes serão qualificados, ou será estabelecida uma faixa de utilização?
- A faixa de utilização abrange todas as configurações de carga?
- Será estabelecido um estudo de “pior caso”, ou cada carga de esterilização será validada?
- Serão usadas duas configurações de cargas (mínima e máxima) ou apenas uma configuração padrão?
- Existe equivalência de projetos entre as autoclaves a serem qualificadas?
- Qual carga será considerada o “pior caso”?
- Será utilizada mais de uma temperatura de exposição, além de 121°C? Caso seja, não poderão ser utilizados indicadores biológicos com valor $D_{121°C}$.

- Qual a resistência térmica das cargas? São termoestáveis?

Os órgãos regulatórios recomendam que todas as cargas termoestáveis, que entram em contato com o produto final, sejam esterilizadas pelo método sobremorte. Não existe nenhuma lei que obrigue a utilização deste método, mas o método escolhido deve fornecer um nível adequado de garantia de esterilidade que deve ser cientificamente comprovado e validado (FDA, 2004; ANVISA, 2006; ISO11134, 2001; OMS, 1997).

O QP deve ser executado nas piores condições de qualificação, simulando as condições mínimas permitidas de tempo e temperatura de exposição das cargas. Os critérios de aceitação do QP devem ser estabelecidos antes do início dos testes e podem ser definidos em protocolos ou em um procedimento operacionais padrões (POP).

E2. Critério de Aceitação

Antes de determinar quais os critérios de aceitação para o ciclo de esterilização, é importante definir quais exigências dos órgãos regulatórios devem ser respeitadas.

Os critérios contidos no plano de QP podem variar de acordo com o tipo de autoclave, tipo de carga e método de esterilização. Eles podem ser iguais ou mais rigorosos que aqueles utilizados em rotina de produção, ou seja, no pior dos casos para a garantia de esterilidade (tempo e temperatura mínima de exposição). Os critérios de QP não podem ser menos rigorosos do que os utilizados na rotina.

Tendo em vista que o QP avalia o desempenho térmico da autoclave quando carregada, ele não avalia a estabilidade do produto após a esterilização por vapor. A avaliação da estabilidade é geralmente feita durante o desenvolvimento do produto. No entanto, é fundamental que os dados do estudo de estabilidade estejam concluídos antes da execução do QP.

E3. Elementos Fundamentais para QP

⇒ Temperatura

Algumas autoclaves monitoram a **Temperatura da Carga** durante todo ciclo. A sonda de carga é um sensor que é colocado dentro de um item da carga para medição de temperatura. Podem existir várias sondas que monitoram diferentes pontos da carga. Geralmente, nestes casos o ciclo é controlado pela temperatura destas sondas.

A **Temperatura do Registrador Gráfico** é fundamental para validação. A fim de garantir a confiabilidade do processo, a autoclave deve conter um registro gráfico de temperatura independente do sistema de controle (ISO11134, 2001). Para ciclos de cargas secas, o sensor de registro deve ser colocado junto ao dreno. Para ciclos de cargas líquidas, o sensor de registro deve ser posicionado junto à sonda de carga. São estabelecidos critérios para uma diferença máxima entre o sensor de registro e o sensor de controle.

A **Penetração de Calor** é registrada através de sensores inseridos no interior dos itens da carga durante todo o ciclo e mede o calor fornecido a cada item. O objetivo não é avaliar a homogeneidade térmica entre os itens das cargas e sim avaliar a penetração de vapor na embalagem e nos poros da carga. Isto é feito através da letalidade acumulada em cada item. Normalmente é usada como referência a mínima letalidade acumulada. Ela pode ser calculada durante o inicio do ciclo até o final da exposição, apenas durante a exposição ou durante todo ciclo. Para cargas sensíveis ao calor, é importante estabelecer critérios para máxima letalidade acumulada.

⇒ Pressão

A **Pressão da Câmara** deve ser avaliada durante a exposição e o resfriamento. Tendo em vista que a pressão é responsável pela manutenção da temperatura de exposição, é fundamental que ela seja coletada por registradores gráficos. Qualquer queda de pressão durante o tempo de exposição impacta diretamente na temperatura de esterilização.

⇒ Montagem e Configuração da Carga

Durante a qualificação pode ser utilizada uma carga fixa, para determinar uma carga padrão, ou cargas máximas e mínimas para determinar uma gama possível de cargas padrões. Acredita-se que a utilização de uma carga fixa padrão, sem avaliação de configurações mínimas e máximas, faz que as configurações de cargas incompletas sejam descartadas ou preenchidas com os itens faltantes. Levando-se em consideração os conceitos termodinâmicos é possível afirmar que isto não é verdade.

⇒ Desafio microbiológico

Todos os órgãos regulatórios exigem que sejam feitos ensaios de desafios microbiológicos durante a validação. A quantidade e o tipo de dados requeridos dependem do método de esterilização utilizado. Existem vários tipos indicadores biológicos para a esterilização de vapor, mas o mais largamente utilizado é o *Geobacillus stearothermophilus* (ou *Bacillus stearothermophilus*).

No **Método Sobremorte***, t*odos os indicadores biológicos deverão ser inativados (não apresentar crescimento microbiológico após incubação a 37°C). Deve ser especificado o valor $D_{121°C}$ e a população de micro-organismo para calcular a letalidade mínima requerida.

No **Método Combinado,** a inativação completa do indicador biológico não é necessária (pode apresentar crescimento), desde que a redução do mesmo equivalha a SAL de 10^{-6} da carga microbiana. Quando não houver a completa inativação, é necessário quantificar o crescimento obtido. A espécie do indicador biológico, o valor $D_{121°C}$, a população inicial e os números de micro-organismos sobreviventes devem ser especificados. Além disso, também deve ser calculado o limite de redução logarítmicas do indicador biológico necessário para carga microbiana alcançar SAL de 10^{-6}.

O **Método de Carga Microbiana Total** deve incluir informações sobre a quantidade e resistência térmica do micro-organismo isolado do ambiente de produção. O isolado ambiental mais resistente deve ser usado como o desafio microbiológico e todos deverão ser esterilizados. Um extenso programa de monitoramento ambiental é necessário para garantir que o ambiente não mudou e que não apareceu um organismo mais resistente que o isolado anteriormente. Caso apareça, este deve ser considerado como desafio microbiológico. A espécie do

isolado ambiental, a resistência térmica (valor $D_{121°C}$) e a população inicial devem ser especificadas.

⇒ Seqüência de ciclo

É importante avaliar se todas as fases do ciclo acontecem na ordem esperada para operação seguindo-se os eventos passo a passo, como por exemplo, porta travada, vapor na jaqueta, vapor na câmara, início de exposição, estabilização atingida, exposição final, início de refrigeração e resfriamento final.

⇒ Localização dos Sensores

Infelizmente, os órgãos regulatórios não regulamentam a quantidade ou o posicionamento dos sensores de temperaturas, dando margem para cada inspetor propor recomendações distintas toda vez que a fabrica é inspecionada.

O mais comum é espalhar aleatoriamente doze sensores (um em cada item da carga), onde as posições são diferentes em cada estudo, abrangendo todas as áreas da autoclave ao longo do tempo. A fim de avaliar o comportamento do vapor em diversos itens com formatos distintos, não se deve posicionar mais de um sensor no mesmo item ou em itens idênticos. O ideal é usar posições aleatórias para a maioria dos sensores e fixar um sensor no ponto frio. Os pontos de medição devem ser os mesmos em que estão localizados os indicadores biológicos. Para isso, eles são amarrados nas extremidades dos sensores.

⇒ Esterilização de filtro de efluentes

O monitoramento de temperatura e o desafio microbiológico são necessários para demonstrar a eficácia da esterilização do filtro. Nada impede que sejam feitos separadamente da qualificação da câmara interna, mas ambos os estudos devem ser concluídos para considerar o QP finalizado.

⇒ Calibração

A fim de garantir a confiabilidade de medição, a calibração do sistema de medição de temperatura usado para validação deve ser verificada antes e depois de cada programa de testes seqüenciais (ISO11134, 2001). Os órgãos regulatórios não definem os desvios máximos permitidos entre as verificações, mas levando-se em consideração que um erro de 1°C propaga um erro de 22,4% no cálculo de

letalidade, é recomendado que o desvio máximo não seja maior que 1°C. Isto pode ser demonstrado abaixo.

$$
\begin{aligned}
&Fo = 10^{\frac{120°C - 121,1°C}{10°C}} \\
&Fo = 10^{-0,11} \\
&Fo = 0,776\,\text{min} \\
&Erro = 1\,\text{min} - 0,776\,\text{min} \cong 22\%
\end{aligned}
\qquad (10)
$$

ANEXO F – Trabalho publicado no XVIII COBEQ