



Universidade do Porto
FEUP Faculdade de Engenharia



Em jeito formal, agradeço ao Eng.º José Domingos Santos, por todo o apoio, dedicação e compreensão prestados ao nível da orientação das disciplinas de seminário e estágio.

Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Disciplina de Estágio

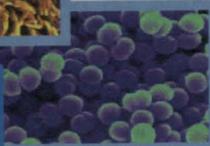
ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS CERÂMICOS PARA APLICAÇÃO MÉDICA

Gostaria de agradecer à Eng.ª Ascensão Lopes, por toda a disponibilidade e orientação prestadas durante a realização do presente trabalho.

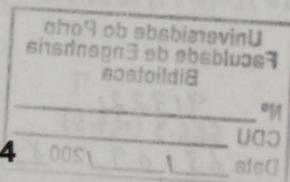
Agradeço de igual modo ao Eng.º José S. Guedes, Diretor Técnico da Lda - Indústria Cerâmica, e ao Eng.º Patrício, responsável pelo total desenvolvimento do trabalho.

Com a colaboração da cristobalite, Fundação de Tecnologia, na implementação laboratorial da Estágio, e do compromisso de muitos outros.

Por último gostaria de agradecer a todos o apoio, em especial à minha irmã Maria Loureiro America, me prestaram, indispensáveis na realização do presente trabalho.



F.E.U.P., 16 de Julho de 2004



Trabalho Orientado por: José Domingos Santos
Trabalho Realizado por: Rita Loureiro America

669(047.3)
 LEMM 2003/AMER

prodep III
 Estágios
 2003-2004
 19 LEMM



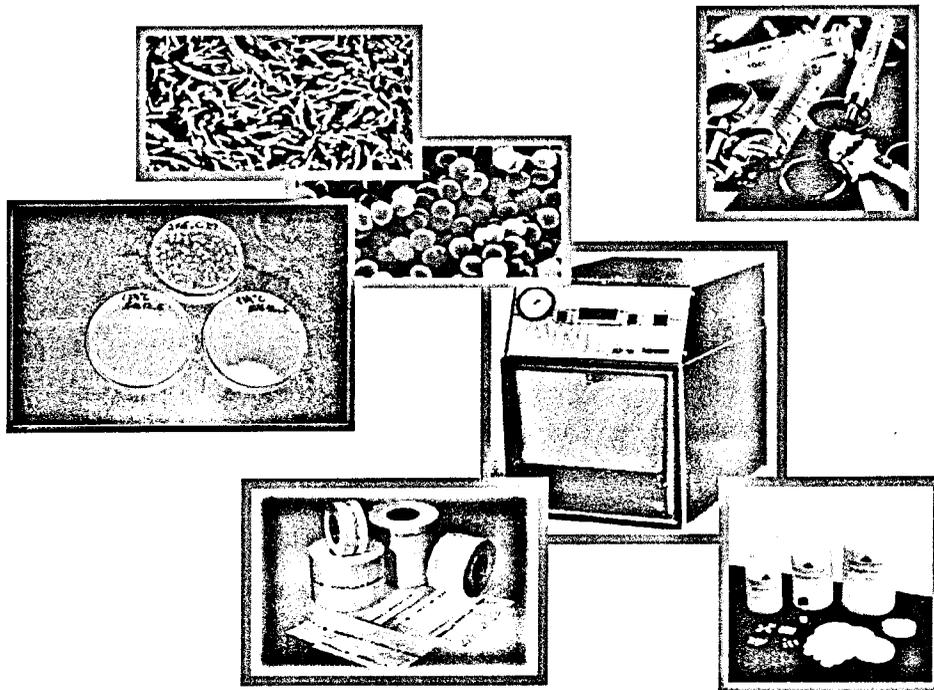
Universidade do Porto
FEUP Faculdade de Engenharia



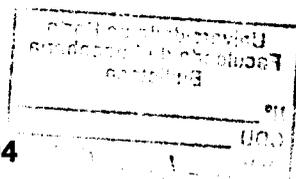
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Disciplina de Estágio

ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS CERÂMICOS PARA APLICAÇÃO MÉDICA



F.E.U.P., 16 de Julho de 2004



Trabalho Orientado por: José Domingos Santos
Trabalho Realizado por: Rita Loureiro America

669(047.3)/LEM 2003/AMin

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca	
Nº	91322
CDU	666.3 (047.3)
Data	03/09/2008

Agradecimentos

Em jeito formal, agradeço ao Eng.º José Domingos Santos, por todo o apoio, dedicação e compreensão prestados ao nível da orientação das disciplinas de seminário e estágio;

Em especial, gostaria de agradecer todo o apoio, dedicação, atenção e orientação prestadas pela Eng^a Manuela Brás, pessoa sem a qual eu nunca conseguia ter realizado este trabalho.

Gostaria de agradecer à Eng^a Ascensão Lopes, por toda a disponibilidade e orientação prestadas, durante a realização do presente trabalho.

Agradeço de igual forma, ao Eng.º José S. Guedes e ao Srº Rui Patrício, Director Técnico Comercial e Técnico de electrónica, da Empresa JSM, Lda – Esterilizadores e Equipamentos Hospitalares respectivamente, pela total disponibilidade em esclarecimento de dúvidas ao nível do tema, orientação e fornecimento de bibliografia apropriada para a realização deste trabalho;

Gostaria também de agradecer a colaboração do Dr. Sooraj Hussein, Bolseiro de Pós-Doutoramento, FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, na preparação laboratorial do Bonelike[®], que constituiu uma grande ajuda na compreensão de muitos conceitos relacionados com o tema;

Por último, gostaria também de agradecer todo o apoio moral e ajuda que todos os meus amigos, em especial ao Jorge Augusto Conceição e família, em especial à minha irmã Marta Loureiro America, me prestaram, indispensáveis na realização do presente trabalho.

Índice

1. Lista de Abreviaturas.....	3
2. Lista de Tabelas.....	4
3. Lista de Figuras.....	5
4. Preâmbulo.....	6
5. Objectivo.....	7
6. Introdução Teórica.....	8
6.1. Nutrição, Crescimento e Morte dos Microorganismos.....	8
6.1.2 Exigências Nutricionais.....	8
6.1.3. A Curva de Crescimento.....	10
6.1.3.1. Fase Estacionária Inicial.....	10
6.1.3.2 Fase Exponencial.....	10
6.1.3.3 Fase Estacionária Máxima.....	11
6.1.3.4. Fase de Morte.....	11
6.1.4. Meios de cultura.....	11
6.1.4.1. Cultura e Isolamento de Microorganismos.....	12
6.2. A Esterilização.....	13
6.2.1. A Esterilização pelo Calor Húmido – Os Autoclaves.....	13
6.2.1.1. O Autoclave Horizontal.....	14
6.3 O Bonelike®.....	15
7. Materiais e Métodos.....	16
7.1 A Produção do Bonelike®.....	16
7.1.1. Preparação da Hidroxiapatite (Ha).....	16
7.1.1.1 Reagentes Químicos Necessários.....	16
7.1.2. Preparação do Vidro Bioactivo.....	17
7.1.3. Preparação do Bonelike®.....	17
7.2. Esterilização do Bonelike®.....	21
7.2.1. Ciclos de Esterilização.....	21
7.2.2. Ciclo de Esterilização de 121°C.....	22
7.2.3. Ciclo de Esterilização de 134°C Normal.....	23
7.2.4. Ciclo de Esterilização de 134°C Instrumentos.....	24
7.2.5. Ciclo de Esterilização de 134°C Rápido.....	25
7.3. Esterilização do Equipamento/Material usados nos ensaios de Microbiologia.....	26
7.3.1. Esterilização da Câmara de Fluxo Laminar.....	26
7.3.2. Esterilização do Material.....	26
7.4. Ensaio Microbiológicos.....	26
7.4.1. Material utilizado nos ensaios de Microbiologia.....	27

8. Apresentação e Discussão de Resultados	30
8.1. Apresentação de Resultados	30
8.1.1. Crescimento Microbiológico por Ciclo	33
8.1.2. Crescimento Microbiológico (Período de Incubação).....	34
8.2 Discussão de Resultados	35
8.2.1. Controlos do equipamento e material de vidro	35
8.2.2. Controlos do Bonelike® não autoclavado.....	35
8.2.3. Ensaio do Bonelike® autoclavado.....	35
8.2.3.1. Ciclo de esterilização a 121°C	35
8.2.3.2. Ciclo de esterilização a 134°C Rápido	35
8.2.3.5. Ciclo de esterilização a 134°C Instrumentos	36
8.2.3.6. Ciclo de esterilização a 134°C Normal	36
9. Conclusões	37
10. Sugestões de Melhoria	38
11. Bibliografia	39

1. Lista de Abreviaturas

Ha – Hidroxiapatite

DRX – Difraccção de Raio-X

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho (vem do inglês: Fourier Transformed Infrared)

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento (vem do inglês: Scanning Electron Microscopy)

UV – Ultra Violeta

UFC's – Unidade de Formação de Colónias

2. Lista de Tabelas

Tabela 1 – Categorias nutricionais de organismos numa classificação que combina a natureza das fontes de carbono e de energia [1]. (Pág.9)

Tabela 2 – Classificação dos meios de cultura [1]. (Pág.12)

Tabela 3 – Valores obtidos na quantificação física por DRX (análise Rietveld). (Pág.20)

Tabela 4 – Características dos ciclos de esterilização. (Pág.21)

Tabela 5 – Contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os controlos. (Pág.30)

Tabela 6 – Contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os controlos. (Pág.31)

Tabela 7 – Contagem UFC's às 24, 48 e 72 horas para os Ensaios. (Pág.32)

Tabela 8 – Crescimento microbiológico por ciclo. (Pág.33)

Tabela 9 – Crescimento microbiológico (Período de Incubação). (Pág.34)

3. Lista de Figuras

- Figura 1** – Ciclo de crescimento e morte de uma cultura de bactérias [2]. (Pág.10)
- Figura 2** – Autoclave horizontal fabricado na empresa JSM – José Santos Monteiro, Lda [5]. (Pág.14)
- Figura 3** – Diagrama de fluxo que representa a preparação do Bonelike®. (Pág.18)
- Figura 4** – Difractogramas de DRX obtidos para a Ha e Bonelike®. (Pág.19)
- Figura 5** – Espectro de FTIR da Ha e do Bonelike®. (Pág.19)
- Figura 6** – Imagem de SEM da Hidroxiapatite. (Pág.20)
- Figura 7** – Imagem de SEM do Bonelike®. (Pág.20)
- Figura 8** – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização. (Pág.22)
- Figura 9** – Ciclo de esterilização de 121°C. (Pág.22)
- Figura 10** – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização. (Pág.23)
- Figura 11** – Ciclo de esterilização de 134°C Normal. (Pág.23)
- Figura 12** – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização. (Pág.24)
- Figura 13** – Ciclo de esterilização de 134°C Instrumentos. (Pág.24)
- Figura 14** – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização. (Pág.25)
- Figura 15** – Ciclo de esterilização de 134°C Rápido. (Pág.25)
- Figura 16** – Desinfectar as mãos com álcool. (Pág.27)
- Figura 17** – Desinfecção em chama do goblé. (Pág.28)
- Figura 18** – Desinfecção em chama do gargalo do frasco da água esterilizada. (Pág.28)
- Figura 19** – Diagrama de fluxo para os ensaios microbiológicos. (Pág.28)
- Figura 20** – Diluição dos pós em água esterilizada. (Pág.29)
- Figura 21** – Da esquerda para a direita: dobragem da pipeta à chama (espalhadores); colocação do Bonelike® em solução na placa de Petri; Espalhamento da solução em placa de Petri em meio de cultura com nutriente Agar. (Pág.29)
- Figura 22** – Identificação das Placas de Petri semeadas. (Pág.29)
- Figura 23** – Incubação na Estufa a 37°C. (Pág.29)
- Figura 24** - Crescimento microbiológico em placa de Petri: a grânulo de Bonelike; b colónia de bactérias; c fungos. (Pág.34)

4. Preâmbulo

Os processos utilizados para impedir o desenvolvimento de microrganismos, quer por ocasionarem a morte, a remoção dos microrganismos ou a inibição do seu desenvolvimento, podem facilitar o tratamento da doença, prevenir infecções do corpo humano e evitar a contaminação de culturas puras, produtos alimentares ou de preparações farmacêuticas. Vários agentes físicos e químicos podem ser usados para se obter a desejada isenção de microrganismos. A selecção do método adequado depende, além da natureza do próprio agente, do tipo de material contaminado a tratar [1].

Hoje em dia, a esterilização, envolve numerosos processos, com princípios de funcionamento distintos, extremamente inovadores e especializados. Todos os desenvolvimentos realizados nesta área, têm surgido em grande parte aliados à medicina, o que se compreende muito bem, devido à imensa necessidade da esterilização nos grandes centros hospitalares, e também no que concerne à indústria Farmacêutica.

A aplicação destes processos de esterilização é muito vasta, passando pelos mais variados materiais, alimentação, etc.

Desde há algum tempo, que se têm desenvolvido variadas investigações em volta dos materiais cerâmicos com aplicação médica, que, devido a características especiais, são aplicados no corpo humano, para tratamento de doenças específicas, nomeadamente na especialidade da medicina ortopédica e medicina dentária etc.

Para se proceder ao estudo da esterilização de materiais cerâmicos à base de fosfatos de cálcio para aplicação médica, foram preparadas amostras sob a forma granular, utilizando processos de sinterização.

Numa segunda fase, foram aplicados ciclos de esterilização em autoclave, com a realização de quatro ciclos distintos: três programas à temperatura de 134°C, mas com tempos de esterilização e secagem diferentes; e, um programa à temperatura de 121°C.

No final, foram realizados testes bacteriológicos, para se validar todo o processo de esterilização.

5. Objectivo

A realização deste trabalho, tem como objectivo, o estudo das condições de esterilização de materiais cerâmicos à base de fosfatos de cálcio para aplicações médicas.

Numa primeira fase do trabalho, realizado na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, preparou-se o material que se pretende esterilizar (Bonelike[®]), utilizando processos de sinterização.

Numa segunda fase, procedeu-se ao seguimento do trabalho na empresa JSM – José dos Santos Monteiro, Lda, aplicando-se às amostras do material já seladas, ciclos de esterilização em autoclave.

Numa fase final do trabalho, realizaram-se testes bacteriológicos, no INEB – Instituto de Engenharia Biomédica, para se validar todo o processo de esterilização.

6. Introdução Teórica

6.1. Nutrição, Crescimento e Morte dos Microorganismos

6.1.2 Exigências Nutricionais

O crescimento de qualquer ser vivo é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção da célula. De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais. Alguns podem crescer exigindo apenas compostos inorgânicos, enquanto outros estão mais próximos dos organismos superiores quanto às suas exigências em compostos orgânicos complexos [1].

A água representa cerca de 80-90% do peso total das células sendo, por isso, um factor fundamental. Outros nutrientes essenciais são o carbono, oxigénio, hidrogénio, azoto, enxofre, magnésio, fósforo, que são considerados macronutrientes, isto é, nutrientes que são exigidos em quantidades relativamente elevadas e que desempenham papéis fundamentais na estrutura e metabolismo da célula. Os micronutrientes ou elementos mínimos, exigidos em menores quantidades mas funcionalmente muito importantes, incluem o manganês, cobalto, cobre, molibdénio, zinco. Muitos deles são essenciais para a actividade de certas enzimas funcionando como cofactores. Muitos microrganismos mutantes necessitam de nutrientes acessórios, conhecidos por factores de crescimento. São substâncias que, fazendo parte da célula, não podem ser sintetizadas por aqueles microrganismos: aminoácidos, purinas, pirimidinas são, respectivamente, componente das proteínas e dos ácidos nucleicos. As vitaminas, por outro lado, são componentes de coenzimas e grupos prostéticos. Os microrganismos mutantes, que têm estas exigências acessórias, são conhecidos por auxotróficos, por oposição aos prototróficos, que não requerem esses factores nutricionais para o seu crescimento [1].

Os microrganismos, são agrupados mediante as suas exigências nutricionais e, tendo em conta a natureza da fonte de energia e na sua principal fonte de carbono. A Tabela 1, resume as categorias nutricionais de organismos [1].

6.1.3. Tabela 1 – Categorias nutricionais de organismos numa classificação que combina a natureza das fontes de carbono e de energia [1].

Categorias Nutricionais	Fonte de Carbono	Fonte de Energia	Organismo (Exemplos)
Fotoautotrófico	CO ₂	Luz	Algas, bactérias fotossintéticas
Fotoheterotrófico	Composto orgânico	Luz	Bactérias fotossintéticas, arqueobactérias halófilas
Quimiolitoautotrófico	CO ₂	Inorgânica	Eubactérias nitrificantes e oxidantes do enxofre
Quimiolitoheterotrófico	Composto orgânico	Inorgânica	Algumas arqueobactérias metanogénicas
Quimiorganoautotrófico	CO ₂	Orgânica	Eubactérias metilotróficas autotróficas
Quimiorganoheterotrófico	Composto orgânico	Orgânica	Fungos, protozoários, a maior parte das eubactérias

As espécies bacterianas são caracterizadas por um crescimento exponencial, ou seja, com velocidades elevadas. Como a velocidade de crescimento está directamente relacionada com a proporção do metabolismo, pode então dizer-se que: quanto maior o organismo em questão, mais lentamente ele cresce [2].

Em qualquer tipo de célula, o processo de reprodução, requer a presença de um enorme número de proteínas e enzimas. Para além disso, outras moléculas têm que estar presentes, tais como: ácidos nucleicos, lípidos e glícidos.

A existência de três macromoléculas orgânicas complexas, é de extrema importância: DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico) e proteínas. O DNA é a substância celular, que serve de suporte para toda a informação genética e que surge no núcleo da célula. O RNA está envolvido intimamente com os padrões complexos de síntese das proteínas, e, a maior parte desta substância, situa-se no citoplasma da célula. As proteínas, por sua vez, funcionam como catalisadores ou enzimas responsáveis pelas variadas operações da célula [2].

6.1.3. A Curva de Crescimento

Através de numerosos estudos em diversas espécies de microorganismos, chegou-se à conclusão de que o poder reprodutivo das células não se mantém para sempre. As populações microbianas tornam-se limitadas devido a factores como a escassez de nutrientes essenciais e equilíbrios iónicos desfavoráveis (pH) que se desenvolvem através da acumulação de substâncias tóxicas no meio ambiente. A história de qualquer cultura é marcada por uma série de fases consecutivas no crescimento. A Figura 1, representa o ciclo de vida e morte de uma cultura bacteriana [2].

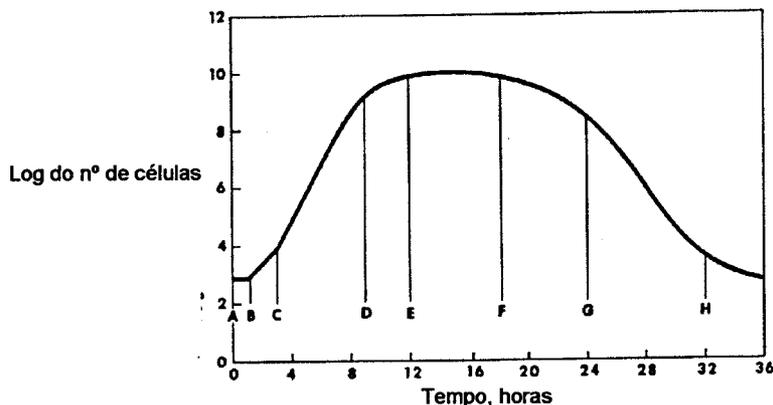


Figura 1 – Ciclo de crescimento e morte de uma cultura de bactérias [2].

6.1.3.1. Fase Estacionária Inicial

No seguimento da inoculação de um líquido com células microbianas viáveis, ocorre um período estacionário, que dura de duas a três horas, no qual o número de células não aumenta. Este período representa um ajustamento e adaptação das células ao seu novo meio ambiente. O curso e a duração desta fase inicial estacionária, depende da natureza das células, do meio de cultura e da temperatura (A até B) [2].

6.1.3.2 Fase Exponencial

Este período de crescimento exponencial é caracterizado por uma velocidade de multiplicação celular máxima e constante num meio ambiente específico.

Nesta fase, certos factores regem a velocidade de crescimento, como: espécies microbianas, natureza e concentração dos nutrientes no meio, pH e temperatura de incubação. Em culturas líquidas comuns, a fase exponencial não dura mais de duas a quatro horas, mas, pode prolongar-se quando se procede a um arejamento do meio. Com isto, não quer dizer que a velocidade de multiplicação no meio aumente necessariamente, mas pode manter-se constante durante mais algum tempo. Quando a concentração celular atinge valores de 1×10^7 de células por ml, o crescimento diminui, a não ser que seja adicionado oxigénio, fazendo-o borbulhar no meio. Durante esta fase, o número de organismos aumenta exponencialmente com o tempo, e, quando se

relaciona o logaritmo do número de organismos com o tempo, o gráfico resultante é uma recta. No gráfico da figura 4, esta fase é representada na secção de C até D [2].

6.1.3.3 Fase Estacionária Máxima

Nesta fase, o número máximo de organismos viáveis permanece constante. Esta fase, diz respeito à secção de E até F, na curva de crescimento. Neste período estacionário, o que realmente acontece, é que, a velocidade com que morrem e se formam as células é a mesma, fazendo assim com que se anulem. O facto de que, com o tempo, começam a existir carências alimentares, e também a possibilidade de existir a acumulação de produtos tóxicos que resultam do metabolismo celular, podem também constituir factores para o cessar do crescimento e o iniciar desta fase. O prolongamento desta fase, é limitado pela deficiência de oxigénio, só perdurando, assim, aquelas espécies capazes de produzirem esporos resistentes [2].

6.1.3.4. Fase de Morte

A secção de F até H, mostra esta fase, através do declínio da curva. Nesta fase, é atingida uma velocidade de morte constante, em que, o número de sobreviventes é cada vez mais pequeno, até que se atinge a esterilidade e o ciclo de crescimento é completo.

Pode acontecer que, após a maioria das células morrerem, a velocidade a que a morte acontece, pode diminuir significativamente, devido a que uma pequena quantidade de células pode sobreviver durante meses. Isto, deve-se ao facto desta população sobrevivente alimentar-se de possíveis restos de nutrientes disponíveis [2].

6.1.4. Meios de cultura

O conhecimento sobre os mecanismos e exigências da nutrição microbiana permite ao microbiologista cultivar microrganismos em laboratório, usando substratos alimentares – *meio de cultura* – adequados. Neles, se poderão *multiplicar, isolar e identificar microrganismos*, por utilização de técnicas apropriadas.

Na sua composição, os meios de cultura deverão incluir os nutrientes indispensáveis ao organismo em causa, sob forma assimilável. Quantitativamente, os nutrientes deverão estar presentes em concentrações adequadas e não tóxicas, tais que, a carência de qualquer um deles não impeça a utilização dos demais.

Para além dos nutrientes requeridos às exigências dos microrganismos, o meio de cultura deve ser estéril, isto é, não deve conter quaisquer organismos vivos. Os micróbios têm uma distribuição ubiqüitária e, devido às suas reduzidas dimensões, dispersam-se facilmente. Devemos esterilizar o meio de cultura após a sua preparação para eliminar os microrganismos contaminantes. É, também, necessário ter precauções durante o seu sub-sequente manuseamento, a fim de evitar posteriores contaminações. As técnicas usadas para a prevenção de contaminações durante a manipulação de culturas e meios de cultura estéreis, são designadas técnicas de assepsia. Os meios de

cultura, depois de inoculados, devem ser incubados a temperaturas adequadas. Outras exigências essenciais ao crescimento dos microrganismos deverão, também, ser contempladas, tais como o pH, tensão de oxigénio, actividade da água, valores que deverão situar-se dentro da gama tolerada pelos diferentes microrganismos.

Em termos gerais, os meios de cultura podem ser classificados de acordo com três principais aspectos: estado físico, composição química, objectivos funcionais. A Tabela 2, representa a classificação dos meios de cultura.

Tabela 2 – Classificação dos meios de cultura [1].

Estado Físico	Líquido Sólido Semi-sólido
Composição Química	Quimicamente definidos Quimicamente complexos
Objectivos Funcionais	Simples Selectivos Diferenciais Enriquecidos

Quando se torne desejável utilizar meios sólidos em vez de meios líquidos, um agente solidificante, tal como o agar, deverá ser incorporado no meio de cultura. O agar é um polissacarídeo complexo, extraído de algas vermelhas. Tem a propriedade de, na concentração de 1 – 1,5%, fundir à temperatura de 100°C, permanecendo líquido até que esta desça a 40-42°C, temperatura que não afecta a maior parte dos microrganismos. O agar, ao contrário de outras substâncias (gelatina), não é biodegradado pelos microrganismos, não perdendo o seu poder solidificante. Esta característica torna-o de grande utilidade em Microbiologia. Os meios sólidos fornecem, assim, uma superfície firme, na qual o crescimento das células vai dar origem a colónias. Os meios semi-sólidos têm uma consistência pouco firme, pois contêm uma pequena quantidade de agente solidificante. São usados, por exemplo, para permitir a motilidade de microrganismos móveis [1].

6.1.4.1. Cultura e Isolamento de Microrganismos

Devido ao pequeno tamanho dos microrganismos, a quantidade de informação que pode ser obtida a partir do seu exame individual é limitada. Assim, de um modo geral, os microbiologistas estudam populações microbianas. Tais populações são obtidas pelo crescimento dos microrganismos em condições mais ou menos bem definidas – culturas. Uma cultura que tem apenas um tipo de microrganismo é conhecida por cultura pura. Uma cultura que tem mais do que um tipo de microrganismo é uma cultura mista.

A cultura e o isolamento de microrganismos são duas operações básicas em Microbiologia: Cultura – crescimento de populações microbianas em meios

laboratoriais; isolamento – separação de um dado microrganismo a partir de populações mistas [1].

6.2. A Esterilização

Os processos de esterilização e desinfecção permitem o controlo e o desenvolvimento dos microrganismos. São métodos essenciais no tratamento e prevenção de infecções, na prevenção de contaminação de culturas microbianas puras e na indústria farmacêutica e alimentar.

Embora esterilização e desinfecção signifiquem remoção de microrganismos, entende-se por Esterilização, a completa destruição ou remoção de todas as formas de vida, quer patogénicas quer não patogénicas, enquanto que desinfecção consiste na remoção de determinado objecto ou superfície da totalidade ou de parte dos microrganismos patogénicos.

Os agentes que são utilizados para destruir ou impedir o crescimento de microrganismos, designam-se por agentes microbianos e podem ser físicos ou químicos. Vários factores, tais como concentração da população microbiana, temperatura, duração do contacto com os microrganismos, natureza do material a descontaminar (presença de material orgânico, pH e viscosidade) e características dos microrganismos presentes, condicionam a eficácia dos agentes utilizados na esterilização ou desinfecção [1].

6.2.1. A Esterilização pelo Calor Húmido – Os Autoclaves

A Esterilização pelo Calor Húmido obtém-se utilizando o Vapor de Água Saturado. Os equipamentos utilizados para este efeito, são os Autoclaves. Os Autoclaves são recipientes cuja construção lhes permite trabalhar sob pressão [3].

Por definição, o Vapor de Água é aquele que é obtido à temperatura de ebulição da água, que se convencionou serem 100° C [4].

A morte dos microrganismos através do calor húmido sobre pressão, é causada através da desnaturação e coagulação da proteína ou do sistema enzima-proteína nas células. É utilizada a água como catalisador das reacções [4].

O Vapor de Água em condições de saturação, é o meio mais eficaz e mais capaz, com vista à destruição de todas as formas de vida microbiana, sendo por vias disso, o mais utilizado nos Hospitais [4].

O contacto directo com o vapor saturado, constitui a base deste processo. O vapor, com um tempo específico, à temperatura requerida, tem que penetrar em todas as fibras, e, atingir todas as superfícies a serem esterilizadas. Quando é feito entrar vapor na câmara de condensação, ele condensa em contacto com os produtos a esterilizar. Esta condensação, liberta calor, molhando e aquecendo todos os produtos a esterilizar, ou seja, promove-se calor e humidade [4].

6.2.1.1. O Autoclave Horizontal

O Autoclave Horizontal difere radicalmente do Autoclave Vertical, logo no formato da Câmara de Esterilização; o Autoclave Horizontal possui a referida Câmara na posição horizontal, e não com a forma cilíndrica, mas sim com a forma rectangular.

Outra diferença fundamental, é que o Autoclave Horizontal tem porta de acesso que funciona no sentido vertical deslizante e não basculante e manual como no Autoclave Vertical.

Construtivamente falando, o Autoclave Horizontal é constituído por um duplo corpo em Aço Inoxidável, sendo que o corpo interior corresponde à Câmara de Esterilização, e o corpo exterior à denominada Camisa; esta tem como missão, ajudar a suportar mecanicamente as pressões de trabalho do Autoclave, e contribuir para o pré-aquecimento e secagem das cargas a esterilizar e esterilizadas, respectivamente [3].

No Autoclave Horizontal, é possível realizarem-se ciclos de Esterilização com perfil adequado às exigências dos diversos materiais a esterilizar, de que se falará à frente em pormenor [3].

O Autoclave Horizontal é o equipamento de Esterilização por excelência, sendo o mais aplicado nos Estabelecimentos de Saúde; onde hajam cuidados médicos a prestar de: Consultas, Pequena Cirurgia, Cirurgia, UCI e Internamento, o Autoclave Horizontal é sem dúvida o mais utilizado.

Deve-se referir nesta conformidade, que o Autoclave Horizontal actua como peça central de um conjunto de áreas e componentes, que se agrupam no Serviço de Esterilização, a saber: zona de Recepção, Lavagem e Desinfecção, zona de Preparação e Empacotamento, zona de Esterilização e zona de Armazenamento e Expedição [3].

Os ciclos ou programas de Esterilização, são uma sequência automática de fases que se processam cumprindo uma determinada ordem, com o objectivo de esterilizar a carga pretendida, nomeadamente Têxteis ou cargas porosas, Instrumentos Cirúrgicos ou cargas não absorventes, acondicionados ou não em caixas metálicas próprias (contentores) e material que não suporte temperaturas acima de 125°C [3]. A Figura 2, representa um autoclave horizontal fabricado na empresa JSM – José Santos Monteiro, Lda.



Figura 2 – Autoclave horizontal fabricado na empresa JSM – José Santos Monteiro, Lda [5].

6.3 O Bonelike®

Usando um processo de sinterização em fase líquida de vidros com o sistema base $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, com espécies iônicas facilmente encontradas nos tecidos ósseos, são incorporados na matriz da hidroxiapatite. Após se sinterizar a microestrutura deste compósito registado como Bonelike® ele é maioritariamente composto por uma hidroxiapatite substituta com quantidades controladas das fases β e $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP).

Enxertos de ossos homólogos e autogéneos, têm sido usados em implantologia, cirurgia maxilofacial e em ortopedia. No entanto, a restrita disponibilidade de osso autogéneo associado com o esforço do paciente causado por uma segunda cirurgia e também os riscos de transmissão da doença constituem desvantagens importantes destes tipos de enxertos ósseos. Enxertos ósseos sintéticos, como a hidroxiapatite, têm sido usados mas, eles diferem na composição química e cristalográfica quando comparados com o tecido ósseo natural. Para além disso, a hidroxiapatite tem baixa reabsorção *in vivo*, o que pode constituir uma desvantagem em muitas aplicações médicas. Uma controlada reabsorção combinada com uma formação simultânea de osso novo, é de longe um compromisso fundamental para muitas aplicações médicas de enxertos ósseos [4].

Vários enxertos ósseos têm vindo a ser propostos, devido a oferecerem melhores alternativas à hidroxiapatite, principalmente aquelas que oferecem um patamar superior, onde as células ósseas conseguem crescer rapidamente e oferecerem melhores condições para os cirurgiões. Existem diferentes formas no mercado, desde grânulos macroporosos até grânulos densos, blocos macroporosos pequenos e massas. Se as massas que solidificam e que são biodegradáveis, são consideradas como sendo muito favoráveis em termos de assegurar a estabilização dos grânulos na área afectada, também têm algumas desvantagens.

O Bonelike® é um compósito sintético de hidroxiapatite que foi inicialmente reportado, como sendo um compósito de hidroxiapatite reforçado com vidro, cujas composições químicas e cristalográficas foram propositadamente reguladas para simular a parte inorgânica dos tecidos ósseos usando um vidro com o sistema básico $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, adicionado ao processo de sinterização. Estes vidros são adicionados no estado líquido, e a temperatura de sinterização da hidroxiapatite, normalmente ronda os 150-1300°C. O líquido espalha-se através da estrutura da hidroxiapatite [4].

Usando esta técnica, não só a estrutura do Bonelike® fica livre de porosidade, acompanhado de um melhoramento incrível das propriedades mecânicas, como também permite a substituição iónica no arranjo atómico da hidroxiapatite, como foi demonstrado previamente. Espécies iônicas vulgarmente encontradas na parte mineral do osso do tecido ósseo, tais como, sódio, potássio, magnésio e iões fluoreto, podem ser facilmente incorporados na estrutura do Bonelike®. A simulação da composição química da parte mineral dos tecidos ósseos, é possível por este processo. Estudos *in vitro* provaram que o Bonelike®, estimula muito mais a formação de novo tecido ósseo à volta dos grânulos e implantes, quando comparado com a hidroxiapatite comercialmente disponível, principalmente com tempos curtos de implantação[4].

7. Materiais e Métodos

Neste capítulo, são descritos os procedimentos utilizados para a realização do presente trabalho, assim como, a apresentação dos resultados obtidos e sua discussão.

7.1 A Produção do Bonelike®

A produção do Bonelike®, é dividida em três etapas, de acordo com o diagrama da figura 3:

- Preparação da Hidroxiapatite;
- Preparação do Vidro Bioactivo;
- Preparação do Compósito (mistura da Hidroxiapatite com o Vidro);

O compósito é constituído por 97,5% em peso de Hidroxiapatite e por 2,5% em peso de vidro bioactivo, significando que, se se pretende preparar 100g de compósito, ter-se-á que adicionar 97,5g de hidroxiapatite com 2,5g de vidro.

7.1.1. Preparação da Hidroxiapatite (Ha)

O método de preparação utilizado na preparação da hidroxiapatite foi o método de reacção em solução. A reacção química que traduz a síntese da Ha é descrita pela seguinte equação 1:



7.1.1.1 Reagentes Químicos Necessários

Hidróxido de Cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)
Ácido Fosfórico (H_3PO_4)

Para a produção de 100g de hidroxiapatite pesaram-se numa balança analítica (Mettler-Toledo, BB5001-5) 74,09468g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 69,03499g de H_3PO_4 descrito no procedimento experimental da Figura 3.

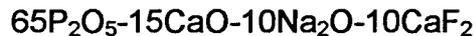
Para a adição da solução de H_3PO_4 à solução $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Fig. 3 ponto 2) utilizou-se uma bomba peristáltica (Gilson, Minipuls). Durante a adição, lavou-se periodicamente o tanque com água desionizada, devido à formação de um precipitado.

Após a secagem, (Fig.3 ponto 5), retirou-se uma pequena quantidade, sinterizou-se a 1300°C e analisou-se por Difracção de raio-X.

7.1.2. Preparação do Vidro Bioactivo

Para a preparação do vidro Bioactivo, pesaram-se os reagentes químicos respectivos e misturam-se num cadinho de platina (Fig.3, ponto7).

O vidro bioactivo pertence ao sistema:



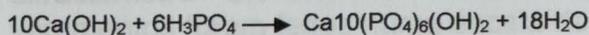
Para a produção de 25g de vidro bioactivo pesaram-se numa balança analítica 16,3231g de P_2O_5 , 4,0818g de CaO , 2,1198 de Na_2O e 1,5616g de CaF_2 .

7.1.3. Preparação do Bonelike®

O compósito foi obtido pela mistura de 2,5% em peso de vidro, com a Ha numa mistura com iso-propanol (Fig.3, ponto 15). O compósito foi seco durante 24h a 60°C, em estufa (Binder). O compósito foi crivado de forma a obter uma granulometria inferior a 75µm. De seguida foi prensado, com uma prensa isostática (National Force Europe, Industry Park NOORD7) isostaticamente com uma pressão de 200 Mpa. Finalmente, o Bonelike® foi sinterizado (forno Termolab, Eurotherm 2408) a 1300°C durante 1 hora.

Todo o equipamento foi limpo com água desionizada e desinfectado com álcool, bem como os materiais utilizados. Foram utilizadas luvas de látex, bata e máscara cirúrgica.

Reacção de síntese da hidroxiapatite



Vidro Bioactivo

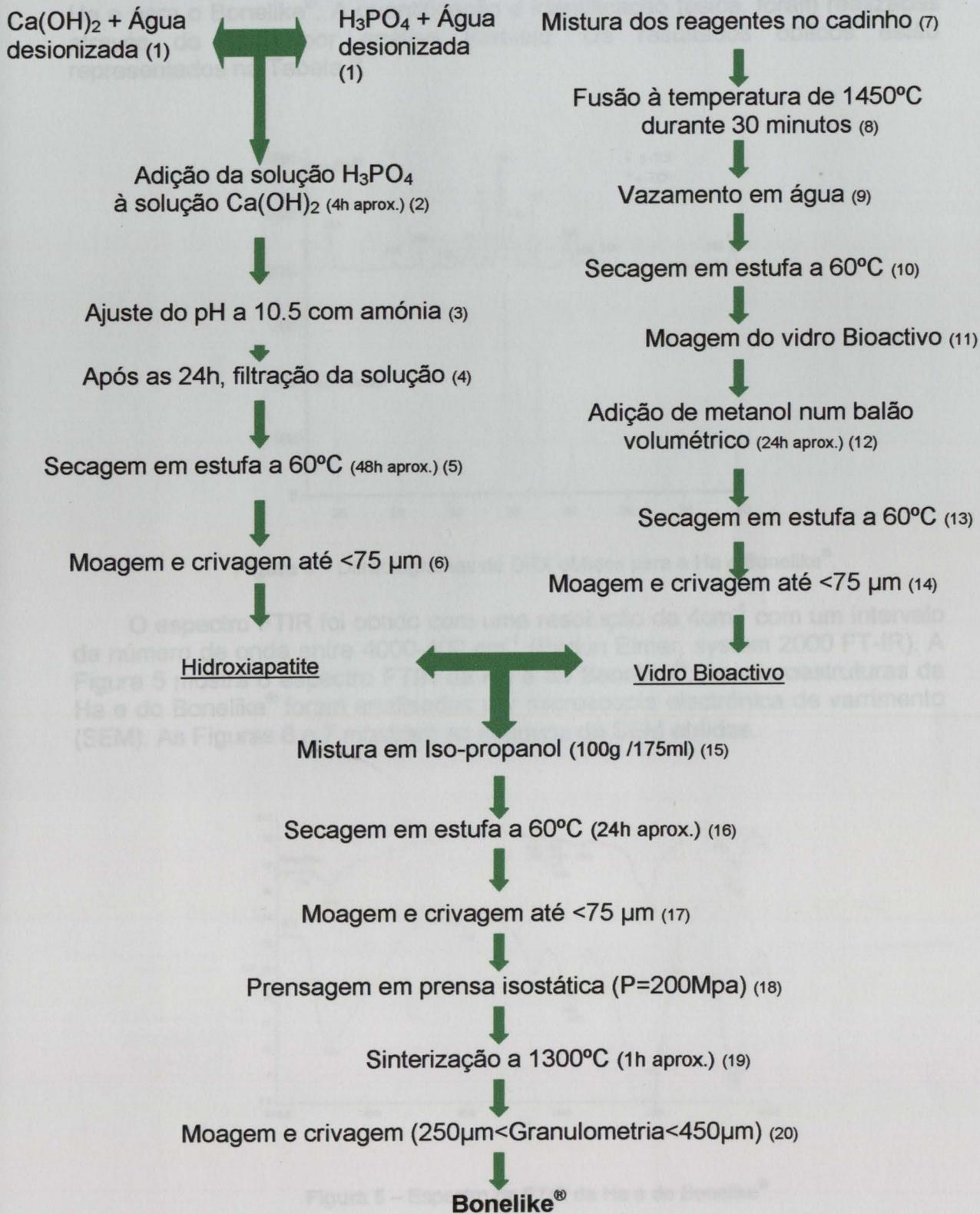
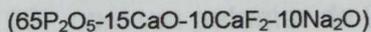


Figura 3 – Diagrama de fluxo que representa a preparação do Bonelike®.

A DRX foi realizada em amostras de pó de Ha e Bonelike[®], usando um difractómetro Siemens D 5000 com radiação Cu-K_α (λ=1,5418Å). Os varrimentos foram feitos numa escala de 25-39° (2θ), com um patamar de 0,02° e um tempo de 2s/patamar. A figura 4 mostra os difractogramas obtidos para a Ha e para o Bonelike[®]. A quantificação e identificação fásica, foram realizadas através da DRX por análise Rietveld. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.

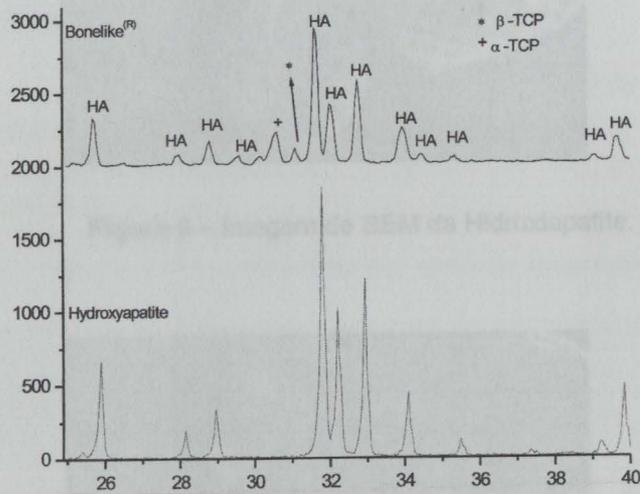


Figura 4 – Difractogramas de DRX obtidos para a Ha e Bonelike[®].

O espectro FTIR foi obtido com uma resolução de 4cm⁻¹ com um intervalo de número de onda entre 4000-400 cm⁻¹ (Perkin Elmer, system 2000 FT-IR). A Figura 5 mostra o espectro FTIR da Ha e do Bonelike[®]. As microestruturas da Ha e do Bonelike[®] foram analisadas por microscopia electrónica de varrimento (SEM). As Figuras 6 e 7 mostram as imagens de SEM obtidas.

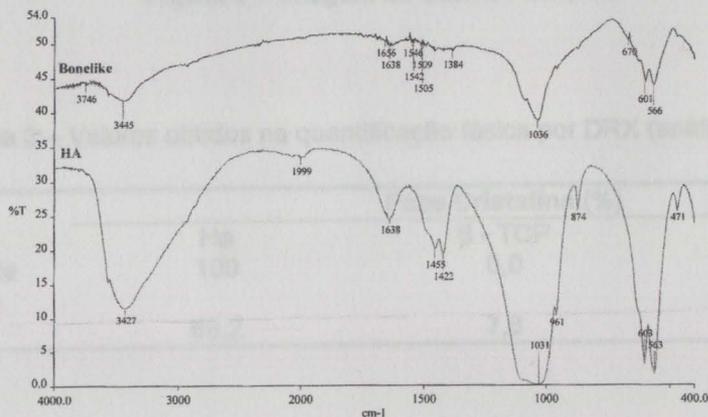


Figura 5 – Espectro de FTIR da Ha e do Bonelike[®].

7.2. Esterilização da Bonelike®

O Bonelike®, é dividido em porções. Em seguida, conforme a dispersão, cada ciclo de esterilização é realizado a 134°C normal, 134°C

7.2.1. Ciclos de Esterilização

As características descritas na Tabela 3. Todas as peças são esterilizadas (JSM, 70L 2 PD 12V)

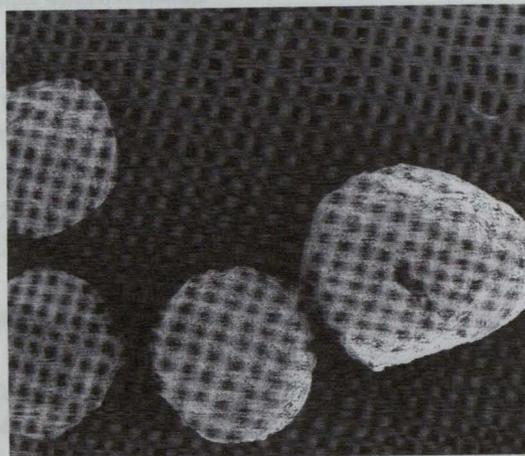


Figura 6 – Imagem de SEM da Hidroxiapatite.

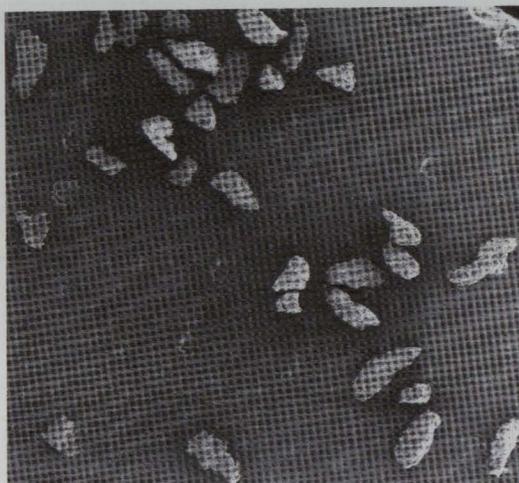


Figura 7 – Imagem de SEM do Bonelike®.

Tabela 3 – Valores obtidos na quantificação física por DRX (análise Rietveld).

Materiais	Fase Cristalina (%)		
	Ha	β - TCP	α - TCP
Hidroxiapatite Sinterizada	100	0,0	0,0
Bonelike®	68,2	7,8	24,0

7.2. Esterilização do Bonelike®

O Bonelike®, foi embalado em manga mista de papel/filme de polietileno e dividido em porções de 1g, usando uma máquina de selagem (Steriline, 1023).

Em seguida, as amostras foram colocadas no cesto do autoclave, conforme a disposição indicada nas figuras seguintes, que correspondem a cada ciclo de esterilização. Os ciclos de esterilização empregues foram: 121°C, 134°C normal, 134°C instrumentos e 134°C rápido.

7.2.1. Ciclos de Esterilização

As características de cada um dos ciclos de esterilização realizados, estão descritos na Tabela 4.

Todos os ciclos de esterilização foram realizados num autoclave horizontal (JSM, 70L 2 PD GV PN).

Tabela 4 – Características dos ciclos de esterilização.

Amostra (gramas)	Número de amostras	Temperatura dos ciclos (°C)	Número de Pulsados	Tempo de Esterilização (minutos)	Tempo de Secagem (minutos)
1 grama	5	121°C	3	15	10
1 grama	10	134°C Normal	3	7,5	10
1 grama	9	134°C Instrumentos	3	4	10
1 grama	8	134°C Rápido	1	3,5	5

Figura 4 – Ciclo de esterilização de 121°C

7.2.2. Ciclo de Esterilização de 121°C

Este ciclo é utilizado na maioria dos centros hospitalares para a esterilização de produtos com componentes de borracha etc., que não aguentam temperaturas superiores.

A Figura 8 representa o esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização no ciclo de esterilização de 121°C.

A Figura 9 representa o ciclo de esterilização de 121°C.

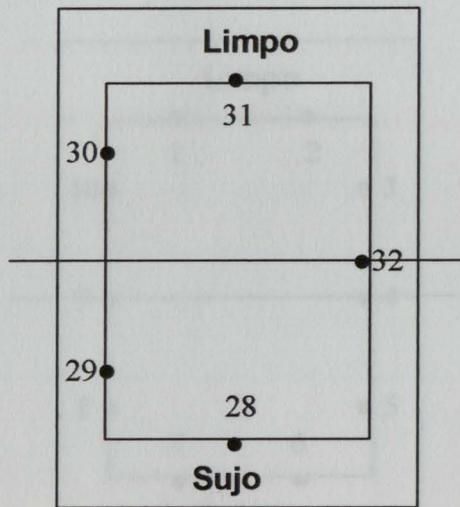


Figura 8 – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização

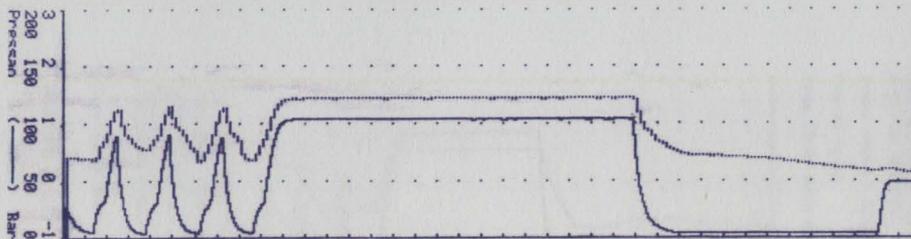


Figura 9 – Ciclo de esterilização de 121°C.

7.2.3. Ciclo de Esterilização de 134°C Normal

Este ciclo é utilizado na maioria dos centros hospitalares para a esterilização de utensílios, instrumentos cirúrgicos e também têxteis etc.

A Figura 10 representa o esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização no ciclo de esterilização de 134°C Normal.

A Figura 11 representa o ciclo de esterilização de 134°C Normal.

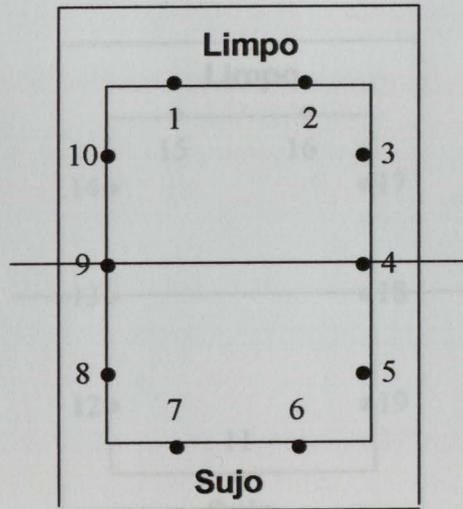


Figura 10 – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização.

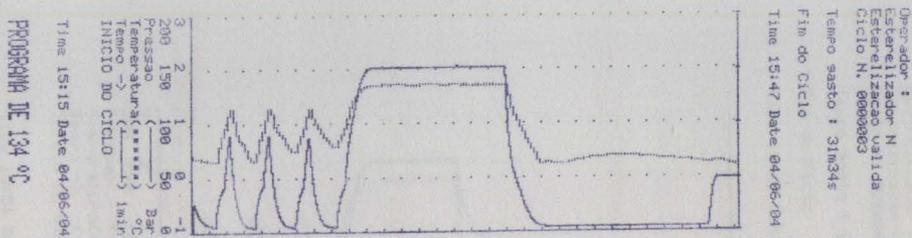


Figura 11 – Ciclo de esterilização de 134°C Normal.

7.2.4. Ciclo de Esterilização de 134°C Instrumentos

Este ciclo é usado na maioria dos centros hospitalares para a esterilização de instrumentos cirúrgicos, com tempos de esterilização mais curtos do que no ciclo referido anteriormente.

A Figura 12 representa o esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização no ciclo de esterilização de 134°C Instrumentos.

A Figura 13 representa o ciclo de esterilização de 134°C Instrumentos.

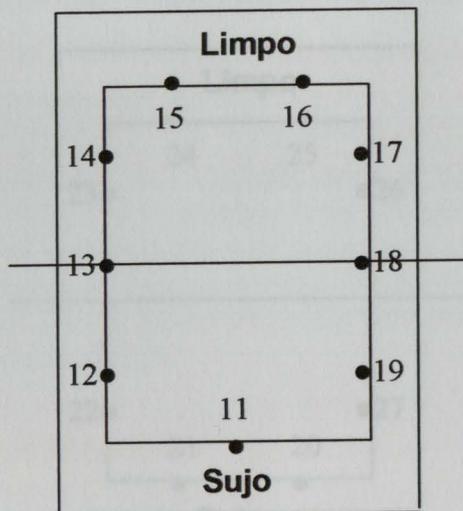


Figura 12 – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização.

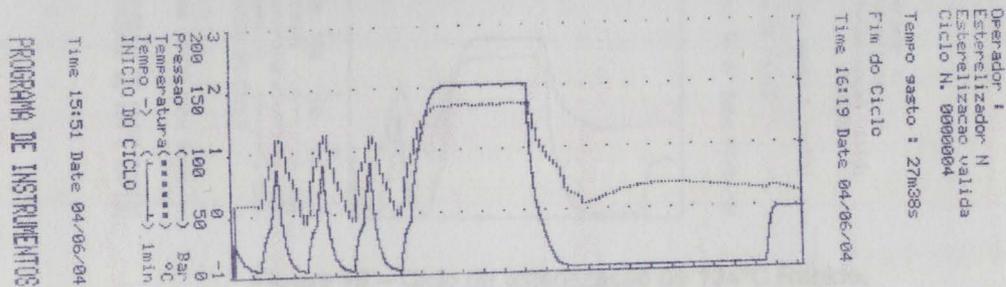


Figura 13 – Ciclo de esterilização de 134°C Instrumentos.

7.2.5. Ciclo de Esterilização de 134°C Rápido

Este ciclo é utilizado na maioria dos centros hospitalares para a esterilização de instrumentos em zonas esterilizadas, por exemplo, esterilização urgente de instrumentos cirúrgicos durante uma intervenção cirúrgica.

A Figura 14 representa o esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização no ciclo de esterilização de 134°C Rápido.

A Figura 15 representa o ciclo de esterilização de 134°C Rápido.

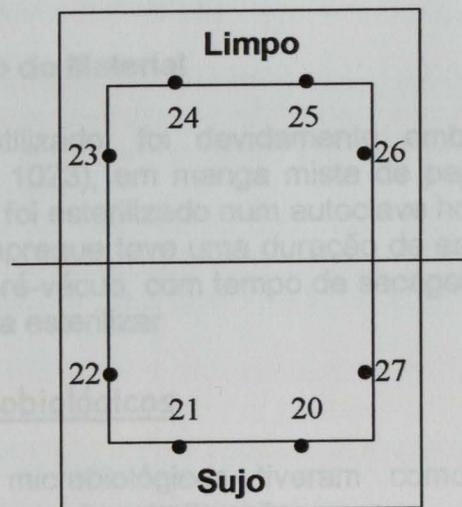


Figura 14 – Esquema de disposição das amostras na câmara de esterilização.

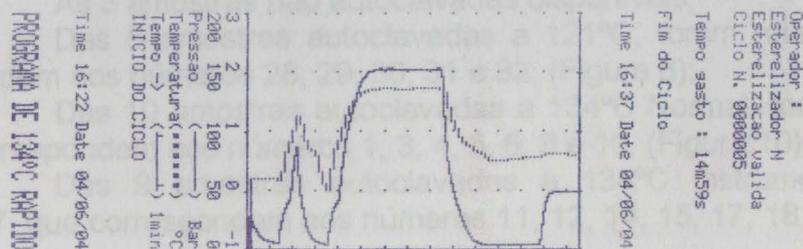


Figura 15 – Ciclo de esterilização de 134°C Rápido.

7.3. Esterilização do Equipamento/Material usados nos ensaios de Microbiologia

Foi usada uma câmara de fluxo laminar (Sanyo, MCV-131BNF) para os ensaios microbiológicos.

Foram utilizados 28 goblés, 30 varetas e 40 pipetas de Pasteur esterilizados.

7.3.1. Esterilização da Câmara de Fluxo Laminar

A esterilização da câmara, foi realizada com radiação UV, com lâmpadas UV-C, *overnight*.

7.3.2. Esterilização do Material

O material utilizado, foi devidamente embalado numa máquina de selagem (Steriline, 1023), em manga mista de papel/filme de polietileno. Em seguida, o material foi esterilizado num autoclave horizontal (Tuttnauer). O ciclo de esterilização empregue teve uma duração de esterilização de 20 minutos e de 10 minutos de pré-vácuo, com tempo de secagem variável (10 –20 minutos) consoante a carga a esterilizar

7.4. Ensaios Microbiológicos

Os ensaios microbiológicos tiveram como objectivo o estudo da viabilidade do processo de esterilização.

Das 35 amostras disponíveis para se realizar os ensaios microbiológicos, retiraram-se:

- As 3 amostras não autoclavadas disponíveis;
- Das 5 amostras autoclavadas a 121°C, foram retiradas 5, que correspondem aos números 28, 29, 30, 31 e 32, (Figura 8);
- Das 10 amostras autoclavadas a 134°C Normal, foram retiradas 7, que correspondem aos números 1, 3, 4, 5, 6, 8 e 10, (Figura 10);
- Das 9 amostras autoclavadas a 134°C Instrumentos, foram retiradas 7, que correspondem aos números 11, 12, 14, 15, 17, 18 e 19, (Figura 12);
- Das 8 amostras autoclavadas a 134°C Rápido, foram retiradas 5, que correspondem aos números 21, 22, 25, 26 e 27, (Figura 14).

Estas amostras que foram retiradas, vão ser sujeitas a testes microbiológicos, para assim se testar a viabilidade do processo de esterilização.

7.4.1. Material utilizado nos ensaios de Microbiologia

- lamparina de álcool;
- placas de nutriente com meio de cultura nutriente Agar (Biogerm);
- 0,5l de água esterilizada (Biogerm);
- 28 goblés;
- 30 varetas;
- 40 pipetas de Pasteur;
- gaze esterilizada;

Usou-se uma incubadora a 37°C (Raypa,I-288) para os 2 tempos de incubação testados: 24 e 48 horas. O 3º tempo de incubação (72 horas) foi realizado à temperatura ambiente.

Sendo os ensaios microbiológicos, procedimentos que requerem condições assépticas elevadas, o chão da câmara de fluxo laminar, foi limpo diversas vezes com álcool, ao longo do procedimento, apesar de ter estado sob efeito das radiações UV.

Para se manter as condições de assepsia, as luvas sofreram permanentemente desinfecção com álcool (Figura 16). Sempre que se pretendeu desempacotar qualquer material esterilizado, este foi aberto no interior da câmara.



Figura 16 – Desinfetar as mãos com álcool.

Evitou-se ao máximo permanecer com as mãos no exterior da câmara de fluxo laminar, assim como os goblés e o frasco de água esterilizada foram postos em contacto com a chama constantemente (Fig.17 e Fig.18).

No início dos ensaios, realizaram-se controlos microbiológicos, fazendo-se testar o material utilizado, a água esterilizada, o ar da câmara de fluxo laminar bem como o chão desta, as varetas, os goblés e os espalhadores.



Figura 17 – Desinfecção em chama do goblé.



Figura 18 – Desinfecção em chama do gargalo do frasco da água esterilizada.

O procedimento seguido para os ensaios microbiológicos está descrito na Figura 19.

Realização dos controlos microbiológicos em placa de Petri com meio de cultura nutriente Agar

Diluição dos pós em água esterilizada (Figura 20)

Espalhamento das soluções preparadas em placa de Petri com com meio de cultura nutriente Agar (Figura 21)

Identificação das Placas de Petri semeadas (Figura 22)

Incubação na Estufa a 37°C (Figura 23)

Verificação do crescimento microbiológico após 24 horas (contagem UFC's)

Verificação do crescimento microbiológico após 48 horas (contagem UFC's)

Colocação das placas de Petri à temperatura ambiente

Verificação do crescimento microbiológico após 72 horas (contagem UFC's)

Figura 19 – Diagrama de fluxo para os ensaios microbiológicos.

8. Apresentação e Discussão de Resultados

8.1. Apresentação

Todos os resultados obtidos nos controles efectuados, como os resultados obtidos nas tabelas a seguir representadas, foram os resultados obtidos na contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os materiais de vidro, água esterilizada e o material de vidro. A Tabela 6 descreve os resultados obtidos na contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os materiais realizados no Bonelike[®] que foi autoclavada, com os dados de esterilização definidos na Tabela 4.



Figura 20 – Diluição dos pós em água esterilizada.



Figura 21 – Da esquerda para a direita: dobragem da pipeta à chama(espalhadores); colocação do Bonelike[®] em solução na placa de Petri; Espalhamento da solução na placa com meio de cultura nutriente Agar.



Figura 22 – Identificação das Placas de Petri semeadas.



Figura 23 – Incubação na Estufa a 37°C.

Legenda: b – bacilos; f – fungos; NCB – não cultivado bacteriano; NCF – não cultivado fungo; ——— meio não utilizado

8. Apresentação e Discussão de Resultados

8.1. Apresentação de Resultados

Todos os resultados obtidos na contagem de UFC's, tanto nos controlos efectuados, como nos ensaios realizados estão sintetizados nas tabelas a seguir representadas. A Tabela 5 descreve os resultados obtidos na contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os controlos realizados ao material de vidro, água esterilizada, gaze, ar e chão da câmara. A Tabela 6 descreve os resultados obtidos na contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os controlos realizados ao Bonelike® que não foi autoclavado. A Tabela 7 descreve os resultados obtidos na contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os ensaios realizados ao Bonelike® que foi autoclavado, com os ciclos de esterilização definidos na Tabela 4.

Tabela 5 – Contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os controlos.

Controlos		A		B		C	
		1º Ensaio	2º Ensaio	1º Ensaio	2º Ensaio	1º Ensaio	2º Ensaio
Varetas	24h	0	-----	0	-----	0	-----
	48h	0	-----	0	-----	0	-----
	72h	0	-----	0	-----	0	-----
Espalhadores	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
Goblés	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
Água esterilizada	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
Gaze esterilizada	24h	0	-----	0	-----		
	48h	0	-----	0	-----		
	72h	0	-----	0	-----		
Ar da câmara de fluxo laminar	24h	0	0				
	48h	0	0				
	72h	0	0				
Chão da câmara de fluxo laminar	24h	2b	0				
	48h	2b / 1f	0				
	72h	2b / 1f	0				

Legenda: b – bactéria; f – fungo; NCb – não contável bactéria; NCf – não contável fungo;
----- - ensaio não realizado

Tabela 6 – Contagem de UFC's às 24, 48 e 72 horas para os controlos

Controlos		A	B	C
Não autoclavado1	24h	0	0	0
	48h	0	0	0
	72h	0	0	0
Não autoclavado2	24h	4b	NCb	125b
	48h	1b / 4f	NCb	139b
	72h	1b / 4f	NCb	139b
Não autoclavado3	24h	0	0	0
	48h	NCb / +24f	27b	0
	72h	NCf	27b / +2f	NCf

Legenda: b – bactéria; f – fungo; NCb – não contável bactéria; NCf – não contável fungo; ----- - ensaio não realizado.

ESTUDO DA ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS CERÂMICOS PARA APLICAÇÃO MÉDICA

Tabela 7 – Contagem UFC's às 24, 48 e 72 horas para os Ensaios.

Ensaio	A	B	C	D	E	F	
134°C N (1)	24h	0	0	0	1b	0	0
	48h	2b	NCb	5b	1b	5f	NCF
	72h	2b	NCb/NCf	8b	1b	+5f	NCF
134°C N (3)	24h	2b / 12f	NCf	2f	0	0	0
	48h	2b / 19f	NCf	3f	1b	0	1b
	72h	+19f	NCf	+3f	1b	0	1b
134°C N (4)	24h	NCb	NCb	NCb	NCb	NCb	NCb
	48h	NCf	NCf	NCf	NCb	NCf	NCF
	72h	NCf	NCf	NCb/NCf	NCb/NCf	NCf	NCf
134°C N (5)	24h	0	NCb	NCb	NCb	0	0
	48h	68b	NCf	20b/NCf	NCb	1f	1b
	72h	72b	NCf	27b/NCf	NCb	+1f	1b
134°C N (6)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	3b	0	0	0	0	0
	72h	3b	0	0	1f	0	0
134°C N (8)	24h	0	1f	1f	6f	NCb	0
	48h	0	1f	1f	1f	NCf	NCF
	72h	+1f	+2f	+1f	+8f	NCf	+1f
134°C N (10)	24h	0	0	0	1b	0	0
	48h	0	0	0	1f	0	0
	72h	1b/NCf	7f	0	1f	0	0
134°C INST (11)	24h	0	1f	NCb	2f	NCb	NCb
	48h	2b	+2f	+3f	3b/+1f	NCf	+2f
	72h	NCb/2f	NCf	NCf	NCf	NCf	NCf
134°C INST (12)	24h	0	0	0	0	0	1f
	48h	0	0	0	0	0	7f
	72h	0	0	0	0	0	7f
134°C INST (14)	24h	33b	NCb	NCb	NCb	NCb	NCb
	48h	33b/NCf	NCb/NCf	NCb	NCb	NCb	22b/NCf
	72h	37b/NCf	NCb/NCf	NCb	NCb	NCb/NCf	23b/NCf
134°C INST (15)	24h	0	0	+1f	5f	NCb	1b
	48h	3f	0	NCf	7f	NCf	1f
	72h	+3f	0	NCf	+7f	NCf	1f
134°C INST (17)	24h	NCb	NCb	0	1f	6f	1f
	48h	NCb	NCb	+2f	+3f	+6f	+3f
	72h	NCb	NCb	NCf	NCf	NCf	NCf
134°C INST (18)	24h	4b	0	0	0	0	0
	48h	6b	0	0	0	0	0
	72h	9b	0	0	7b	0	0
134°C INST (19)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
134°C RÁP (21)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
134°C RÁP (22)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
134°C RÁP (25)	24h	0	0	0	0	0	2f
	48h	0	0	0	0	0	+8f
	72h	0	0	0	0	0	13f
134°C RÁP (26)	24h	0	0	0	0	3f	0
	48h	0	0	0	0	NCf	0
	72h	0	0	0	0	NCf	0
134°C RÁP (27)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	NCf	0	10b	0	0	0
	72h	NCf	0	10b	0	0	0
121°C (28)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
121°C (29)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	9f	0	0	1b
	72h	0	0	10f	0	0	1b
121°C (30)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0
	72h	0	0	0	0	0	0
121°C (31)	24h	0	0	0	0	0	0
	48h	0	+1f	0	0	0	NCf
	72h	0	NCf	0	1f	0	NCf
121°C (32)	24h	0	0	0	0	0	0

Legenda: b – bactéria; f – fungo; NCb – não contável bactéria; NCf – não contável fungo; — - ensaio não realizado

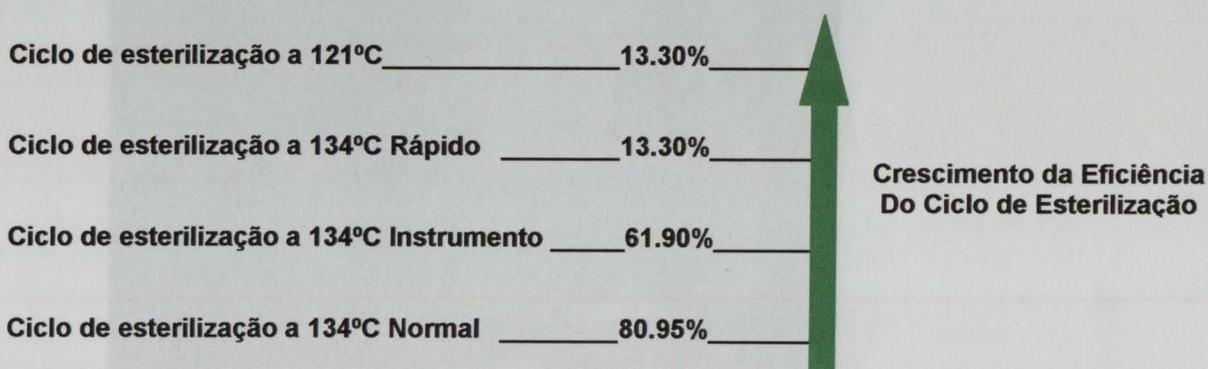
8.1.1. Crescimento Microbiológico por Ciclo

Os resultados obtidos no crescimento microbiológico por ciclo estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Crescimento microbiológico por ciclo.

Ciclo	Contaminação (%)
Não autoclavado	66,67
121°C	13,30
134°C Normal	80,95
134°C Instrumentos	61,90
134°C Rápido	13,30

Mediante os resultados apresentados, em seguida está representado, um diagrama de eficiência.



8.1.2. Crescimento Microbiológico (Período de Incubação)

Os resultados obtidos no crescimento microbiológico (Período de Incubação) estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Crescimento microbiológico (Período de Incubação).

Ciclo	24 horas (%)	48 horas (%)	72 horas (%)
121°C	0	13,3	16,7
134°C normal	42,9	71,4	80,9
134° Instrumentos	52,4	59,5	61,9
134°C Rápido	6,7	13,3	13,3
Não autoclavado	33,3	55,6	66,7

A Figura 24 apresenta 3 placas de Petri nas quais estão indicados 2 tipos de crescimento microbiológicos: (b) bactérias e (c) fungos. A placa de Petri (a), não apresenta qualquer tipo de crescimento microbiológico.

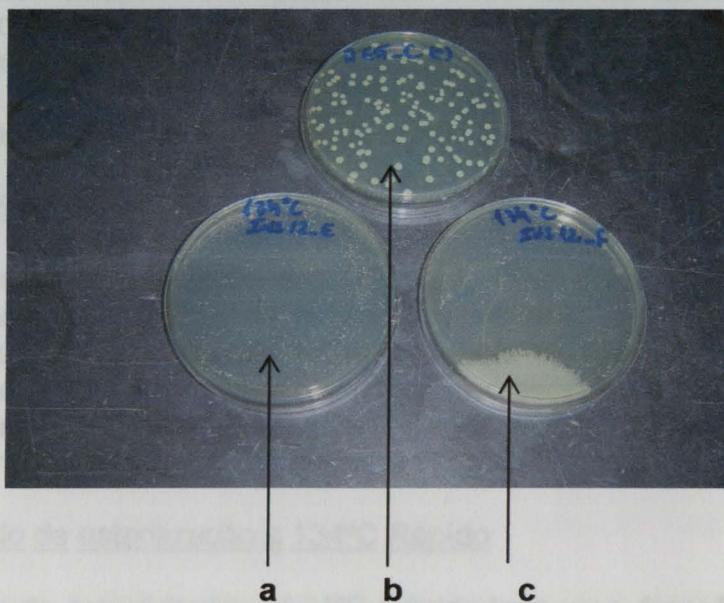


Figura 24 – Crescimento microbiológico em placa de Petri: a grânulo de Bonelike; b colônia de bactérias; c fungos.

8.2 Discussão de Resultados

8.2.1. Controlos do equipamento e material de vidro

Em relação aos controlos efectuados e, analisando Tabela 5, concluir-se que quer a água esterilizada quer material de vidro, não apresentou qualquer tipo de crescimento microbiológico, o que significa que o ciclo de esterilização empregue foi eficaz e que o autoclave utilizado condições eficiente. Relativamente à câmara de fluxo laminar, foram controlados quer o ar, quer chão da mesma. Pela Tabela 5, verificou-se que o controlo realizado no primeiro ensaio ao chão da câmara, apresenta crescimento microbiológico. Este facto deve-se possivelmente ao facto de não ter sido utilizada uma gaze esterilizada na desinfecção do chão da câmara no primeiro ensaio, ao contrário do que foi efectuado no segundo. O controlo do ar da câmara de fluxo laminar, não apresentou qualquer crescimento microbiológico.

8.2.2. Controlos do Bonelike[®] não autoclavado

Obtidas as percentagens de crescimento microbiológico, verificou-se que 66,67% das culturas em placa de Petri do Bonelike[®], apresentaram crescimento microbiológico. Este valor é perfeitamente concordante, visto as amostras deste material não terem sido esterilizadas.

8.2.3. Ensaio do Bonelike[®] autoclavado

8.2.3.1. Ciclo de esterilização a 121°C

O ciclo de esterilização a 121°C teve uma duração de 15 minutos de esterilização e 10 minutos de secagem. Este ensaio, apresentou valores de crescimento microbiológico de 13,30% (Tabela 8). Quando comparado com o produto não autoclavado, verifica-se que o crescimento foi muito inferior. As percentagens de contaminação ao fim das 24, 48 e 72 horas foram respectivamente de 0%, 13,3% e 16,7% (Tabela 9).

8.2.3.2. Ciclo de esterilização a 134°C Rápido

O ciclo de esterilização a 134°C Rápido teve uma duração de 3,5 minutos de esterilização e 5 minutos de secagem. Este ensaio, apresentou valores de crescimento microbiológico de 13,30%(Tabela 8). Quando comparado com o ciclo de esterilização a 121°C, apresenta o mesmo valor de percentagem de crescimento e, quando comparado com o produto não autoclavado, verifica-se que o crescimento foi muito inferior. Em relação ao tempo de incubação verificou-se também, que o crescimento durante as 24, 48 e 72 horas, tomou valores de 6,7% e 13,3% respectivamente (Tabela 9).

8.2.3.5. Ciclo de esterilização a 134°C Instrumentos

O ciclo de esterilização a 134°C Instrumentos teve uma duração de 4 minutos de esterilização e 10 minutos de secagem. Este ensaio, apresentou valores de crescimento microbiológico de 61,90%. Quando comparado com o ciclo de esterilização a 121°C e com o ciclo a 134°C Rápido, apresenta um valor de percentagem de crescimento superior e, quando comparado com o produto não autoclavado, verifica-se que o crescimento foi menor, mas muito significativo. Em termos de tempo de incubação, a percentagem de contaminação também aumentou de 52,4% para 61,9%, entre as 24 horas e as 72 horas (Tabela 9).

8.2.3.6. Ciclo de esterilização a 134°C Normal

O ciclo de esterilização a 134°C Normal teve uma duração de 7,5 minutos de esterilização e 10 minutos de secagem. Este ensaio, apresentou valores de crescimento microbiológico de 80,95%. Quando comparado com o ciclo de esterilização a 121°C e com o ciclo a 134°C Rápido, apresentou um valor de percentagem de crescimento muito superior e, quando comparado com o produto não autoclavado, verifica-se que o crescimento foi maior, e significativo. Este crescimento também foi significativo tomando valores de 42,9%, 71,4% e 80,9% para as 24, 48 e 72 horas respectivamente.

Tanto o ciclo de esterilização de 134°C Normal, como o ciclo de esterilização a 134°C Instrumentos apresentaram valores de crescimento microbiológico muito elevados. Ao serem comparados estes valores, verificam-se que quer o ciclo a 121°C quer o ciclo a 134°C rápido, apresentam valores muito reduzidos de crescimento microbiológico, quando comparados com o produto não autoclavado. O ciclo de esterilização a 121°C, utiliza um pré-vácuo composto por 3 pulsados, utilizando um tempo de esterilização superior a todos os outros ciclos, o que o torna um ciclo bastante eficiente. Mediante os resultados apresentados, os ciclos de esterilização à temperatura de 134°C normal e instrumentos, parecem não se apresentaram nada conclusivos em relação à sua eficiência. Contudo, para que um produto se diga esterilizado, tem que se apresentar totalmente livre de qualquer tipo de crescimento microbiológico, incluindo as espécies esporuladas.

Durante o funcionamento do autoclave, se uma embalagem tiver uma superfície exposta menor, pode não atingir mais rapidamente a mesma temperatura de esterilização das embalagens maiores.

Este tipo de ensaios em microbiologia, devem ser repetidos, para se poder concluir a cerca da eficiência do processo de esterilização, bem como do equipamento utilizado. São testes que exigem um controlo apertado das condições de ensaio e que são facilmente afectados por factores exteriores. Deste modo, deveria ter-se realizado um maior número de ensaios, com amostras de material esterilizadas em diversos ciclos diferentes.

Não foram realizados ensaios de identificação com meios de cultura selectivos, o que seria interessante para se poder identificar as estirpes microbiológicas presentes, podendo-se deste modo saber quais seriam as suas origens, uma vez que existem estirpes características de determinado *habitat*, sabendo-se assim qual seria a sua proveniência.

Uma vez que não foram realizados testes de eficácia ao autoclave, pode-se por em causa o funcionamento deste. É necessária a realização destes testes com endósporos bacterianos produzidos por espécies do género *Bacillus* e *Clostridium*, que são muito resistentes ao calor, a agentes químicos e a radiações, pelo que são utilizados para testar a eficácia de muitos métodos de esterilização.

9. Conclusões

O método de esterilização escolhido para este trabalho foi o método de esterilização por calor húmido. Este método foi aplicado por ser bastante eficaz na destruição dos microrganismos e também por ser um processo de fácil monitorização e bastante económico. Embora seja um processo universal, também apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, a inutilização em produtos fracamente resistentes ao calor.

Surgiu contudo a ideia de se aplicar o método por radiação ionizante, mas não foi possível. Este método é igualmente eficaz mas exige a utilização de equipamentos mais complexos e que exigem uma formação aprofundada.

O número de ensaios de microbiologia efectuados não foi suficiente para decidir a eficácia dos métodos de esterilização realizados, devendo aumentar-se o número de ensaios realizados.

De acordo com os resultados obtidos, o ciclo de esterilização à temperatura de 121°C foi tão eficiente, bem como o ciclo de esterilização a 134°C Rápido, o que pode ser considerado estranho. Isto só prova que de facto os ensaios de microbiologia devem ser repetidos, assim como, revistas as condições de autoclavagem e empregues testes de eficiência do equipamento.

As contaminações poderão dever-se ao autoclave, uma vez que, no 2º ensaio, todos os materiais de controlo (varetas, goblés, água esterilizada, gase esterilizada, chão e ar da câmara), não apresentaram crescimento microbiológico, significando que o crescimento apresentado nas placas de Petri dos materiais, depois dos ensaios, não provieram, provavelmente de qualquer material usado.

Porém, provavelmente alguma da contaminação surgida, foi proveniente da utilização da gaze não esterilizada utilizada para limpar o chão da câmara.

10. Sugestões de Melhoria

- Para o aperfeiçoamento deste trabalho, sugere-se que no futuro, se repitam os ensaios microbiológicos, sendo realizados em maior número, com amostras de material de produção independentes esterilizados com um número de ciclos diferentes.
- Pretende-se também a aplicação de ciclos de esterilização diferentes, bem como a utilização de mais do que um autoclave.
- Sugere-se, se for o caso, a utilização de meios de cultura selectivos para assim se identificar as estirpes microbiológicas presentes. É necessário também relevar o facto de que são testes de manuseamento delicado e trabalho minucioso, pelo que se tem que ter especial cuidado e condições de assepsia o mais rigorosas possível.
- A utilização de testes com endósporos bacterianos produzidos por espécies do género *Bacillus* e *Clostridium*, (muito resistentes ao calor, a agentes químicos e a radiações), são utilizados para testar a eficácia de muitos métodos de esterilização. Assim, sugere-se o emprego deste tipo de testes, para não se duvidar da eficácia do autoclave na análise de resultados provenientes deste tipo de ensaios.

11. Bibliografia

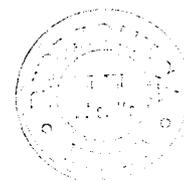
[1] – Ferreira, Wanda F. Canas; Sousa, João Carlos F. – *Microbiologia* – Volume I, págs. 82-90, 221-227, 31,46-49, editora Lidel, Lousã, Setembro de 1998.

[2] - Perkins, John J.; M.S.,LL.D., F.R.S.H. - *Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences* ; Segunda Edição – 1980

[3] - Guedes, José Américo S. - *Desinfecção e Esterilização*

[4] - <http://www.urmc.rochester.edu/Sterile/basics.html>

[5] – www.jsmonteiro.pt





FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000091322



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

prodepIII

Mais Educação