

Esterilização por óxido de etileno. II. Influência de corpos de prova no desempenho de monitores biológicos e sua avaliação*

Ethylene oxide sterilization. II. The influence of test specimens on the performance of biological monitors and its evaluation.

Terezinha de Jesus A. Pinto** & Takako Saito**

PINTO, T. de J.A. & SAITO, T. Esterilização por óxido de etileno. II. Influência de corpos de prova no desempenho de monitores biológicos e sua avaliação. *Rev. Saúde públ.*, S.Paulo, 26: 384-91, 1992. Pela importância da garantia de esterilidade em produto médico-hospitalares e pela predominância da forma tubular dentre estes produtos, conduziu-se o estudo de monitores biológicos em que os corpos de prova apresentavam diferentes comprimentos e diâmetros. O sensor biológico foi constituído de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* adquirido do mercado nacional sob tiras de papel. Após esterilização por processo industrial, seguiu-se a recuperação dos esporos sobreviventes através de inoculação dos suportes em caldo tioglicolato, caldo caseína-soja e este adicionado de azul de bromotímol. A capacidade promotora de crescimento destes 3 meios de cultura não apresentou diferenças. A eficácia esterilizante foi dependente do tamanho de corpos de prova. A determinação periódica do teor residual de gás nos corpos de prova, bem como a monitoração ambiental industrial indicaram a importância da legislação em vigor, devendo ser obedecida a fim de garantir inocuidade aos pacientes e operadores.

Descritores: Esterilização, normas. Monitoramento ambiental, métodos. Óxido de etileno. *Bacillus subtilis*, isolamento.

Introdução

A crescente utilização dos artigos médico-hospitalares, atendendo às necessidades da evolução na ciência médica, quer na terapia invasiva, na monitoração também invasiva, ou nos procedimentos cirúrgicos, induziu a acelerado incremento em diversidade e quantidade, incorporando aos mesmos características de funcionamento, de resistência e de segurança, dentre esta última a de esterilidade.

A sua produção envolve vasta gama de materiais poliméricos²⁰, os quais exigem métodos esterilizantes compatíveis com materiais termolábeis. Atendendo a tais requisitos, permanece ainda o

óxido de etileno, pois não introduz quaisquer riscos por não promover alterações em nível molecular, quando processado dentro das condições adequadas.

Neste recurso ganha fundamental importância o controle em processo, incluindo a utilização de monitor biológico⁹, cujo comportamento permite fazer a interação dos diferentes parâmetros, traduzindo-os numa única resposta de letalidade ou não, ou seja, efetividade ou não no ciclo esterilizante.

Levando em consideração a necessidade nutricional aumentada para a germinação dos esporos danificados por ação química²¹, assim como evidências na importância do tempo dispendido nesse crescimento, objetivou-se, no presente trabalho, a avaliação comparativa da capacidade promotora de crescimento dos caldos tioglicolato, caseína-soja e este adicionado de azul de bromotímol.

Buscando ainda o paralelo entre a grande utilização da forma tubular nos artigos médico-hospitalares e a necessidade de garantia de esterilização dos mesmos, foram testados monitores biológicos contendo corpos de prova com esta conformação. Adicionalmente foi efetuado o acompanhamento do teor residual do óxido de etileno nos mesmos, assim como em ambiente do processo industrial.

A exposição dos operadores ao gás, assim como dos pacientes, em função do uso dos itens

* Parte da tese de Doutorado: "Aspectos Fundamentais na Validação do Monitor Biológico para Esterilização por Óxido de Etileno", apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 1991.

** Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP - Brasil.

Separatas/Reprints: T. de J. A. Pinto - Caixa Postal, 30786-05340-901 - São Paulo, SP - Brasil

Publicação financiada pela FAPESP. Processo Saúde Coletiva 91/4994-0

esterilizados contendo, ainda, resíduo em concentração tóxica deve ser questão preocupante, em vista da alta reatividade do óxido de etileno com diversos sistemas biológicos.

Material e Método

Foram utilizados indicadores biológicos adquiridos no mercado nacional, sendo o sensor constituído de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, depositados em tiras de papel e embalados individualmente em envelope de Glassine^R.

Os corpos de prova foram constituídos de tubos de poli cloreto de vinila (PVC), cujas combinações entre diferentes dimensões resultaram em 20 tipos (5,5; 6,3; 9,5; 12,3mm de diâmetro e comprimentos de 0,5; 2,0; 5,0; 10,0 e 15,0m).

Os 3 meios de cultura, cuja composição foi comparada entre si através da capacidade promotora de crescimento dos esporos, foram o caldo tioglicolato (Difco), caldo caseína-soja (Difco) e este adicionado de azul de bromotímol, na concentração de 25 ug/ml.

Em cada tubo de PVC, independente da dimensão, foram alojados, na porção central geométrica, 3 indicadores biológicos e 1 indicador químico CPL^R. Cada corpo de prova foi embalado em saco de polietileno, de 0,20 mm de espessura, termoselado, constituindo o monitor biológico. Para cada uma das duas condições esterilizantes, perfazendo 5 ciclos cada, foram submetidas 10 réplicas de cada tipo de corpo de prova, o que resultou num total de 2.000 monitores biológicos. Para cada condição esterilizante foram testadas réplicas de 50 monitores de cada combinação, quando se visou a letalidade dos esporos, contemplando 5 ciclos esterilizantes, cada um com 10 réplicas de monitores, de forma a possibilitar séries de 10 tubos para cada meio de cultura. A diversidade de exposição a 2 condições esterilizantes originou 40 diferentes situações e conduziu ao preparo de 2.000 unidades de corpos de prova.

No ciclo industrial a umidade relativa foi na faixa de 60 a 70%, a temperatura entre 45 a 50°C, mas variando a concentração de gás, isto é, 450 - 470 mg/l durante 5 horas e, quando a 600 - 650 mg/l, por 4 horas, em 5 ciclos efetuados, em dias diferentes, para cada combinação.

O ciclo em equipamento laboratorial, com umidade relativa entre 50 e 70%, temperatura entre 50 e 55°C, com 600 - 650 mg/l de gás, teve a exposição por 4 horas. Neste caso, os corpos de prova apresentavam as seguintes dimensões: 5,5mm x 0,5m; 12,3mm x 0,5m; 5,5mm x 15,0m e 12,3mm x 15,0m, tendo sido testadas 3 réplicas de cada tamanho.

Imediatamente após o término do ciclo esterilizante, os monitores biológicos foram transferidos para capela de fluxo laminar, onde cada um foi aberto e cada tira de bioindicador foi inoculada em 20 ml de cada um dos 3 meios de cultura.

A incubação dos tubos foi em estufa a 35 ± 2°C, com observação macroscópica diária por período máximo de 14 dias, anotando-se o aparecimento da turvação e/ou viragem do indicador, conforme o meio. Os indicadores químicos foram verificados quanto à viragem da coloração.

As medições de óxido de etileno (ppm) no ambiente foram efetuadas durante diferentes momentos dos ciclos esterilizantes, em ambos equipamentos.

As determinações, em réplica de 5 para cada situação, foram feitas utilizando tubos reativos da Dragger^R, com sensibilidade de 1 a 15 ppm (1,83 a 27,45 mg/m³), acoplados à bomba tipo "foley" do mesmo fornecedor, à qual se imprimiram 20 bombeamentos, de modo a amostrar 2.000 cm³ de ar.

Os corpos de prova, após exposição aos ciclos esterilizantes, foram mantidos em condição ambiental, sendo submetidos a análise de resíduo gasoso após 5, 7, 13, 14, 15 e 26 dias.

Volumes de 20 e 100 ml de água destilada serviram como líquido extrator, respectivamente, para tubos com 0,5m e 15,0m de comprimento, independente do diâmetro. O contato da água com a parede interna do tubo foi proporcionado através da agitação manual dos tubos, durante 20 min, após vedação das extremidades. Este extrato foi injetado ao cromatógrafo gasoso Varian 1440, equipado com detector de ionização de chama, usando nitrogênio como gás de arraste, na vazão de 30 ml/min. A detecção de óxido de etileno foi em coluna de aço inoxidável, de 2,0m e 1/8 polegadas de diâmetro interno, com Poropak Q como fase estacionária, a 130°C, e as temperaturas do detector e do vaporizador, respectivamente a 160 e 150°C. A determinação quantitativa (ug/unidade) foi feita pelo método da triangulação da área do pico correspondente, através da interpolação deste valor à curva padrão de óxido de etileno, submetido às mesmas condições de análise.

Resultados

Os dados de letalidade dos esporos alojados em diferentes corpos de prova para monitorar as duas condições esterilizantes constam das Tabelas 1 e 2.

O teor de óxido de etileno residual em corpos de prova consta da Tabela 3, enquanto que o de ambiente está expresso na Tabela 4.

Tabela 2: Esporos testados em diferentes corpos de prova, condição esterilizante a 600 mg/l.

Esp. Diam. (mm)	Comprimentos (m)														
	0,5			2,0			5,0			10,0			15,0		
	Tiog.	CS	CS + AB	Tiog.	CS	CS + AB	Tiog.	CS	CS + AB	Tiog.	CS	CS + AB	Tiog.	CS	CS + AB
12 5,5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1,6 9,5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1,4 6,3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2,6 12,3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Esp. = espessura
 Diam. = diâmetro
 Tiog. = meio de Tioglicolato
 CS = meio de Caseína-soja
 AB = azul de Bromolindol
 (-) = letalidade total (0/10)
 Nº fracionário = fração positiva em relação ao total de 10 tubos
 Nº ordinal = tempo de incubação (dias) com resposta positiva (crescimento)

Tabela 3. Teor de óxido de etileno residual em corpos de prova (mcg/unidade) após a exposição por 4 horas, a 600 mg/l e manutenção em ambiente até 26 dias

Dimensões	Tempo (dias)					
	5		7		13	
Área (mm X m)	mcg/unidade	mcg/mm ³	mcg/unidade	mcg/mm ³	mcg/unidade	mcg/mm ³
5,5 X 0,5	1,0	0,842 X 10 ⁻⁴	1,0	0,842 X 10 ⁻⁴	1,0	0,842 X 10 ⁻⁴
12,3 X 0,5	10,1	1,700 X 10 ⁻⁴	9,7	1,633 X 10 ⁻⁴	9,5	1,599 X 10 ⁻⁴
5,5 X 15	15,0	2,695 X 10 ⁻⁵	6,0	1,078 X 10 ⁻⁵	5,5	0,988 X 10 ⁻⁵
12,3 X 15	800,0	447,928 X 10 ⁻³	700,0	391,937 X 10 ⁻³	620,0	347,144 X 10 ⁻⁶
Área (mm X m)	14		15		26	
Área (mm X m)	mcg/unidade	mcg/mm ³	mcg/unidade	mcg/mm ³	mcg/unidade	mcg/mm ³
5,5 X 0,5	1,0	0,842 X 10 ⁻⁴	1,0	0,842 X 10 ⁻⁴	1,0	0,842 X 10 ⁻⁴
12,3 X 0,5	6,1	1,027 X 10 ⁻⁴	3,6	0,606 X 10 ⁻⁴	3,1	0,522 X 10 ⁻⁴
5,5 X 15	4,6	0,827 X 10 ⁻⁵	4,0	0,719 X 10 ⁻⁵	0,4	0,080 X 10 ⁻⁵
12,3 X 15	419,0	234,602 X 10 ⁻⁶	346,0	193,729 X 10 ⁻⁶	55,0	30,795 X 10 ⁻⁵

Tabela 4. Teor de óxido de etileno ambiental (ppm) em condição de trabalho com ciclos laboratoriais (600 mg/l e 20 minutos de exposição) e industriais (A = 450 mg/l, 5 horas de exposição; B = 600 mg/l 4 horas de exposição).

Ciclo	Laboratorial	Industrial A	Industrial B
Início de entrada de gás, próximo ao cilindro e câmara	< 1	< 1 (*)	< 1 (*)
Durante a exposição, próximo à câmara, com ventilação fechada	< 1	< 1 (*)	< 1 (*)
Início de lavagem de câmara, com ventilação fechada	< 1	< 1 (*)	< 1 (*)
Final de lavagem de câmara, com ventilação fechada	< 1	< 1 (*)	< 1 (*)
Abertura da porta, com ventilação fechada	5 (*) (*)	< 1	< 1
Abertura da porta, com ventilação aberta	1 (*) (*)	2	2
Dentro da câmara, no momento da abertura da porta	(-)	5	5

(*) : Medidas no nível chão, \cong 1 m e \cong 3 m de altura, na frente e atrás do equipamento.

(*) (*) : Medida de aproximadamente 20 cm da porta, imediatamente após abertura.

(-) : Não execução.

Discussão

Conforme Brewer e Laughlin⁵, desde Robert Kock, em 1881 foram utilizados esporos de *Bacillus anthrax* como recurso mais efetivo para demonstrar a esterilização. Posteriormente, desde 1956, métodos mais elaborados, incluindo esporos em suporte, em meio de cultura com indicador de pH, passaram a ser empregados como indicadores biológicos. O conceito de monitor biológico surgiu mais recentemente, em 1986, com Hastrup¹¹ defendendo a validade dos diferentes biomonitores para simular as mais variadas condições de produtos hospitalares, durante sua esterilização. Dadd e col.⁹, por sua vez, definiram a interdependência entre esporo, suporte, indicador biológico e monitor biológico.

Os bioindicadores adquiridos no mercado, com quantidade nominal de 10⁶ esporos por suporte, continham de 2 x 10⁵ a 8 x 10⁷, cujos valores são oficialmente aceitos pela USP XXII²⁴.

Com relação à comprovação da letalidade dos esporos submetidos a ciclos esterilizantes, recorreu-se à recuperação dos sobreviventes, de forma qualitativa em função da evidência macroscópica de crescimento em meio líquido.

Buscando a padronização desta questão recorreu-se à utilização de 3 meios de cultura. O caldo caseína-soja é usualmente recomendado nas metodologias oficiais para recuperação de esporos²⁴; da mesma forma, o caldo tioglicolato, pela ampla utilização no teste de esterilidade pelas razões conhecidas e por último, o próprio caldo caseína-soja adicionado do indicador de pH, o azul de bro-

motimol. Também, a presença de agentes redutores, entre eles o tioglicolato, é considerada positiva, sendo ativador parcial dos esporos¹².

Segundo Major¹⁴, tanto o tioglicolato de sódio como o azul de bromotimol apresentam algum efeito inibitório sobre os esporos tratados com óxido de etileno. O que se esperava, particularmente do azul de bromotimol com vantagem, seria a detecção de crescimento devido à viragem do mesmo, anterior ao surgimento da turbidez no meio de cultura. É a linha defendida por Palmieri e col.¹⁹, cujo monitor comporta suporte de papel e ampola com meio de cultura já adicionado de indicador de pH.

Pela avaliação da letalidade dos esporos em monitores, conforme os dados das Tabelas 1 e 2, estes permitem evidenciar a necessidade de maiores concentrações de agente esterilizante para a eficácia do processo, na dependência de formas que dificultam o seu acesso, quando a espessura da parede limita a permeabilidade.

O crescimento evidenciado no 13º dia de incubação pode, eventualmente, estar ligado à permanência dos residuais do agente esterilizante, interferindo com formas ainda viáveis. Porém, os crescimentos detectados precocemente (primeiro e segundo dias), como aqueles observados no ciclo em 450 mg/l de óxido de etileno, em corpos de prova de 50 cm e com 600 mg/l, nos casos com 2m de comprimento, levam à dúvida quanto ao resultado falso-positivo²³. Em casos, por exemplo, de corpos de prova de 15m, mesmo em ciclo com 600 mg/l, a frequência maior de fração positiva deve ter sido em função da dificuldade de acesso do agente esterilizante.

Na detecção de viabilidade em esporos submetidos aos processos esterilizantes, obteve-se percentagens da mesma ordem de grandeza até o 13º, 12º e 15º dias, respectivamente para os meios tioglicolato, caseína-soja e este adicionado de azul de bromotimol. Assim, possivelmente em função do baixo número de frações positivas (de crescimento) detectadas no geral, concluiu-se que houve aparente equivalência na capacidade nutricional dos 3 meios de cultura. Existe unanimidade entre diversos autores quanto à composição do meio e sua capacidade promotora de crescimento, principalmente no caso de esporos submetidos às condições subletais^{8,10,15}.

Fator adicional discutido na recuperação dos esporos envolve o intervalo de tempo entre o término da esterilização e a transferência do suporte ao meio de cultura⁶. Reich²¹ recomenda rápida transferência ao meio de cultura, assim como permanência nesse durante tempo de incubação suficiente para o crescimento, condições que foram respeitadas no presente trabalho. Mais recente-

mente, há tendência de redução desse tempo para abaixo de 7 dias²², desde que previamente comprovados os percentuais dos esporos, com cálculos de redução embasados na sua sensibilidade¹⁸.

Os valores residuais de óxido de etileno, conforme os dados da Tabela 3, evidenciam a preocupação relativa à toxicidade. É bem verdade que, intencionalmente, não se propiciaram aerações forçadas para esses corpos de prova, sequer suas embalagens foram planejadas para fornecer a troca gasosa. Ainda assim, os valores elevados obtidos para os tubos longos, mesmo após 26 dias são surpreendentes.

Diferentes metodologias podem ser empregadas para a determinação de residuais do óxido de etileno^{13,16,25}. O residual nos produtos poliméricos esterilizados varia quanto à adsorção, reação e desorção⁷, conforme sua constituição química e a presença ou não de aditivos.

Na prática médica é comum que se empreguem equipamentos contendo formas tubulares de comprimento unitário variável, muitas vezes para contato com sangue. Portanto, frente à atual legislação nacional⁴, o limite máximo permissível é de 25 ppm para óxido de etileno.

Assim, conforme a Tabela 3, até os corpos de prova com dimensão de 5,5mm x 5,0m apresentam valores enquadrados à exigência, a partir de 7 dias de esterilização.

Este resultado, quando analisado sob o aspecto industrial, apresenta feliz coincidência com o período mínimo de incubação para o teste de esterilidade, desde que pelo método indireto²⁴. Porém, o resultado obtido para a dimensão de 12,3mm x 15,0m rejeitaria o lote do produto mesmo quando considerado o período de incubação para método direto. Esta constatação é alerta para, quando da concepção de um produto, evitar extensões longas desprovidas de "air vents".

Igualmente importante é a toxicidade ocupacional¹⁷. Os dados da Tabela 4 evidenciam a necessidade de ventilação e do sistema eficiente de exaustão interna da câmara, ao final do ciclo. Justifica-se, neste aspecto, a Portaria 80¹, cujo conteúdo foi sendo gradualmente aperfeiçoado através das Portarias interministeriais 982², 150³) e 4⁴.

Em vista da metodologia analítica empregada, a monitoração de resíduo ambiental efetuada no presente trabalho merece crítica pelo não atendimento quanto à quantificação cumulativa, o que é desejável de forma a avaliar possível desvio da exigência de 1 ppm de concentração no ar, para dia normal de 8 horas. Também, picos eventuais de exposição ao gás no período de 15 min, de 10 ppm, não obrigatoriamente seriam detectados. O princípio deste método, devido à sensibilidade, permite, ainda assim, o seu emprego na validação

de sistemas esterilizantes, desde que considerados o momento e a posição de maior risco aos operadores.

Conclusões

Na detecção de formas viáveis após contato dos esporos com agente esterilizante, os meios de caldo tioglicolato, caldo caseína-soja e este adicional de azul de bromotimol não se mostraram limitantes, desde que permitido suficiente tempo de incubação.

Na esterilização de produtos médico-hospitalares envolvendo sistemas tubulares longos, o monitor biológico deve ser constituído por corpos de prova de natureza e conformação muito semelhantes àqueles.

As centrais de esterilização devem exercer monitoração rotineira dos resíduos de óxido de etileno em produtos e ambiente, objetivando segurança de pacientes e de operadores do ciclo esterilizante.

PINTO, T. de J.A. & SAITO, T. [Ethylene oxide sterilization. II. The influence of test specimens on the performance of biological monitors and its evaluation]. *Rev. Saúde públ.*, S.Paulo, 26: 384-91, 1992. In view of the importance of the assurance of the sterility of medical devices, with a large incidence of tubular forms, a study of biological monitors was undertaken, using paper as a carrier, the dimension of the test specimens being the variable considered. After the sterilization process in an industrial cycle, followed by the recovery of the surviving spores through inoculation of the carriers into thioglycolate broth, soybean-casein broth and this last with the addition of bromothymol blue. No differences were found between the growth promoting capacity of these 3 media. The effectiveness of sterilization was dependent on the dimension of the test specimens. The periodic determination of residual gas content on the test specimens, as well as the monitoring of the industrial environment demonstrate the need and importance of the legislation in force.

Keywords: Sterilization, standards. Environmental monitoring, methods. Ethylene oxide. *Bacillus subtilis*, isolation.

Referências Bibliográficas

- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 80 de 13 de fevereiro de 1986. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 fev. 1986. Seção I, p. 2471.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 982 de 29 de dezembro de 1989. *Diário Oficial da União*, Brasília, 03 jan. 1990. Seção I, p. 105-8.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 1510 de 28 de dezembro de 1990. *Diário Oficial da União*, Brasília, 03 jan. 1991. Seção I, p. 51-3.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 4 de 31 de julho de 1991. *Diário Oficial da União*, Brasília, 09 ago. 1991. Seção I, p. 16110-2.
- BREWER, J. H. & Mc LAUGHLIN, C.B. Dehydrated sterilizer controls containing bacterial spores and culture media. *J. Pharm. Sci.*, 50: 171-2, 1961.
- CAPUTO, R.A.; ROHN, K.J.; MASCOLI, C.C. Recovery of biological indicator organisms after sub-lethal sterilization treatment. *J. Parenter. Drug Ass.*, 34: 394-7, 1980.
- CHAIGNEAU, M. Action de l'oxyde d'éthylène sur des matières plastiques, des silicones et des élastomères: absorption et combination. *Ann. Pharm. Fr.*, 38: 315-21, 1980.
- CURRAN, H.R. & EVANS, F.R. The importance of enrichments in the cultivation of bacterial spores previously exposed to lethal agencies. *J. Bacteriol.*, 34: 179-89, 1937.
- DADD, A.H.; Mc CURMICK, K.E.; DALEY, G.M. Factors influencing the resistance of biological monitors to ethylene oxide. *J. appl. Bacteriol.*, 55: 39-48, 1983.
- DION, P. & MANDELSTAM, J. Germination properties as marker events characterizing later stages of *Bacillus subtilis* spore formation. *J. Bacteriol.*, 141: 786-92, 1980.
- HASTRUP, B. Use of biological monitors for validation and cycle control in ethylene oxide sterilization. In: Workshop on Biological Monitoring of Sterilization. 1º, Kerkrade, 1986. *Proceedings*. London, EUCOMED, 1986. p. 57-71.
- KEYNAN, A.; EVENCHIK, Z.; HALVORSON, H.O.; HASTINGS, J. W. Activation of bacterial endospores. *J. Bacteriol.*, 88: 313-8, 1964.
- LACOME, M.; LE MOAN, G.; CHAIGNEAU, M. Méthode de dosage de l'oxyde d'éthylène dans les matières plastiques. *Ann. Pharm. Fr.*, 32: 411-9, 1974.
- MAJOR, M.E. Germination and outgrowth of ethylene oxide (EtO) exposed spores. In: Workshop On Biological Monitoring of Sterilization. 1º, Kerkrade, 1986. *Proceedings*. London, EUCOMED, 1986. p. 222-4.
- MOATS, W. A. Kinetics of thermal death of bacteria. *J. Bacteriol.*, 105: 165-71, 1971.
- NIOSH. Toxic and mutagenic effects on ethylene oxide and propylene oxide on the spermatogenic functions in *Cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*). Apud GOLBERG, L. Hazard assessment of ethylene oxide. Boca Raton, CRC Press, 1986.
- NOGUEIRA, M.H.; COSTA, M.G.P.; SANCHES, E. L.; AVELAR, M.C.Q. Estudo do nível de impregnação do ar ambiental pelo óxido de etileno, numa central de material esterilizado. *Arq. méd. Hosp. Fac. Ciênc. méd. Santa Casa S.Paulo*, 5: 28-33, 1985.
- OXBORROW, G.S.; TWOHY, C.W.; DEMITRIUS, C.A. Determining the variability of Bier vessels for EtO and steam. *Méd. Device Diagn. Ind.*, 12: 78-83, 1990.
- PALMIERI, C.; JANSSEN, D.W.; SCHNEIDER, P.M. Readout reliability of a self-contained steam biological indicator (3M Attest 1261). In: Workshop on Biological Monitoring of Sterilization. 1º, Kerkrade, 1986. *Proceedings*. London, EUCOMED, 1986. p. 225-8.
- PINTO, T.J.A. Controle de qualidade de produtos médico-hospitalares. Características de biocompatibilidade em materiais poliméricos. São Paulo, 1984. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
- REICH, R.R. Effect of sublethal ethylene oxide exposure on *Bacillus subtilis* spores and biological indicator performance. *J. Parenter. Drug Assoc.*, 34: 200-11, 1980.
- REICH, R.R. & GRAHAM, G.S. Performance requirements for biological indicators in the United States. In:

- Workshop On Biological Monitoring of Sterilization. 1^o, Kckrade, 1986. *Proceedings*. London, EUCOMED, 1986, p. 30-41.
23. SAITO, T.; PINTO, T.J.A.; OHARA, M.T. *Esterilidade. Aspecto analítico em produtos farmacêuticos*. São Paulo, s.c.p.,1985.
24. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 22. Ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 1990.
25. WOJCIK O'NEIL, K.M. & ELLO, M. Equivalency of hydrochloric acid and distilled water extration media for determining residual ethylene oxide in medical devices. *J. Pharm. Sci.*, 80: 783-4, 1991.

Recebido para publicação em 22.4.1992

Reapresentado em 21.9.1992

Aprovado para publicação em 22.9.1992