UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento

AMANDA BORGES RIBEIRO DE OLIVEIRA

Proposta metodológica e avaliação da inativação de endósporos de *Geobacillus*
stearothermophilus no tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde por autoclavagem

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2017

AMANDA BORGES RIBEIRO DE OLIVEIRA

Proposta metodológica e avaliação da inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* no tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde por autoclavagem

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Assoc. Valdir Schalch
Coorientador: Prof. Dr. Reinaldo Pisani Júnior

São Carlos

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

048p

Oliveira, Amanda Borges Ribeiro de
Proposta metodológica e avaliação da inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* no tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde por autoclavagem / Amanda Borges Ribeiro de Oliveira; orientador Valdir Schalch; coorientador Reinaldo Pisani Júnior. São Carlos, 2017.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Resíduos de Serviços de Saúde. 2. *Geobacillus stearothermophilus*. 3. Tratamento de resíduos por autoclave. 4. Inativação microbiana. 5. Desinfecção e esterilização de resíduos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **AMANDA BORGES RIBEIRO DE OLIVEIRA.**

Título da tese: "Proposta metodológica e avaliação da inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* no tratamento de resíduos de serviços de saúde por autoclavagem".

Data da defesa: 27/01/2017.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Valdir Schalch**
(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

A PROVA DO

Profa. Dra. **Érica Pugliesi**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

aprovado

Profa. Dra. **Luciana Rezende Alves de Oliveira**

(Universidade de Ribeirão Preto/UNAERP)

aprovado

Profa. Associada **Angela Maria Magosso Takayanagui**

(Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/EERP-USP)

Aprovada

Profa. Dra. **Tais Maria Bauab**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Esse trabalho é dedicado à minha mãezinha

Maria de Lourdes Borges Ribeiro,

a maior responsável pelas minhas vitórias.

Minha eterna companheira!

Agradecimentos especiais:

Ao meu orientador

Prof. Assoc. Valdir Schalch,

*pela confiança depositada em mim, por sua competência
e pelo aprendizado que me proporcionou com tanto carinho e simplicidade.*

Ao meu coorientador

Prof. Dr. Reinaldo Pisani Júnior,

meu maior incentivador a seguir com a jornada,

obrigada por sua dedicação.

À Prof.^a Dr.^a Taís Maria Bauab,

que gentilmente me concedeu um cantinho em seu laboratório,

pela atenção concedida, por tudo que me ensinou

e todo o auxílio oferecido para o desenvolvimento dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que certamente me guiou por todos os dias de viagem entre São Carlos e Araraquara, dias exaustivos de dedicação à pesquisa.

À minha mãe, Maria de Lourdes, que sempre me incentivou e me ensinou a ser melhor, mesmo quando precisei deixá-la sozinha para ir morar distante.

Ao marido, Antônio Cândido de Oliveira Júnior, que sempre esteve comigo (até aos sábados e domingos dedicados a laboratório), sendo amoroso, paciente e compreensivo.

Às Universidade de Franca (UNIFRAN), Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) e agora Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), que contribuíram para minha formação.

À equipe de professores e funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, e em especial do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, que tanto se dedicam ao nosso aprendizado e são sempre prestativos.

À coordenadora da pós-graduação, Prof.^a Dr.^a Maria Bernadete A. Varesche Silva, que através da verba CAPES/PROEX concedeu um auxílio para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por terem me concedido a bolsa de estudos (em momentos diferentes).

Às professoras Dr.^a Taís Maria Bauab, Dr.^a Érica Pugliesi, Dr.^a Luciana Rezende Alves de Oliveira e Dr.^a Angela Maria Magosso Takayanagui, que carinhosamente aceitaram participar como banca examinadora desse doutorado.

Ao Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Unesp – campus Araraquara), que tem como professora responsável a Dr.^a Taís Maria Bauab; ao aluno Matheus Ramos, em especial, e as alunas Bruna Bonifácio e Larissa Sposito, que tanto me ensinaram e me acompanharam em todas as dificuldades que surgiram; e às técnicas Angélica e Silvia, que me auxiliaram quando preciso na preparação e esterilização de materiais; não poderia deixar de também agradecer a deliciosa companhia de todos durante as refeições.

Ao Júlio César Trofino, técnico responsável do Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento (EESC/USP), pela ajuda com esterilização e caracterização das amostras.

Ao José Luiz Guerra, técnico responsável do Laboratório de Mecânica dos Solos do Departamento de Geotecnia (EESC/USP), que contribuiu para a execução da análise granulométrica dos resíduos.

À amiga e madrinha Carolina Ibelli Bianco, sempre companheira dos bons e maus momentos, com quem eu tanto aprendi e que tantas vezes me recebeu em sua casa junto com sua família, a qual também agradeço.

À amiga de infância, madrinha e “professora de inglês”, Aline Ivan Warnken, por toda a ajuda com tradução do resumo e artigo.

À todos que me auxiliaram na coleta dos recicláveis e aos comeram frango assado no almoço de domingo e guardaram os ossos para mim.

À gráfica da EESC/USP, que cortou os papéis utilizados, e ao Sr. Joaquim Favoretto, que concedeu os plásticos já cortados para a pesquisa.

Aos amigos André Luís Gomes Simões e Túlio Queijo de Lima, que me ajudaram no quarteamento dos 32 kg de resíduos.

Enfim, à todos que me apoiaram e contribuíram por mais essa caminhada cheia de vitórias e aos amigos queridos conquistados através do NEPER, Núcleo de Estudo e Pesquisa em Resíduos Sólidos.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

OLIVEIRA, Amanda Borges Ribeiro de. **Proposta metodológica e avaliação da inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* no tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde por autoclavagem**. 2017. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), ainda que tratados e dispostos em aterros sanitários, podem ser causas de impactos ambientais por apresentarem algum indicador de periculosidade. Segundo o apêndice IV da Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) RDC nº 306/2004, para as tecnologias de tratamento desses resíduos é necessário que se atinja pelo menos o Nível III de inativação microbiana. Perante a ausência de dados na literatura que revelassem o tempo de exposição, temperatura e pressão ideais para a inativação microbiana no tratamento de RSS por autoclavagem e se a fração ocupada dos resíduos na autoclave poderia interferir na eficiência da desinfecção definiu-se o objetivo do trabalho para otimização do processo. Para os testes foram utilizados endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* como bioindicadores e instalados cinco termopares na autoclave para aferição da temperatura dentro de todo o espaço da câmara. O RSS foi sintetizado diante das caracterizações como composição gravimétrica, distribuição granulométrica, densidade específica aparente, massa específica aparente e teor de umidade. Apresentou-se uma proposta metodológica para a avaliação do tratamento de RSS frente às dificuldades encontradas. Realizou-se ensaios com 116°C, 125°C e 134°C, observando a fração de inativação em seis tempos de exposição diferentes. Sabendo-se que é padronizada em estabelecimentos de saúde a temperatura ideal para esterilização de materiais de 121°C, apesar de não terem sido encontrados trabalhos científicos que comprovem a eficiência da esterilização nessa circunstância, foram realizados testes a 50 e 60 minutos de exposição para avaliar essa condição. Inoculou-se 10⁶ endósporos nas amostras e a recuperação foi feita com filtração após a lavagem dos resíduos, sendo realizada a técnica de “pour plate” para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O mesmo procedimento foi feito com a amostra retirada da autoclave. A fração de inativação dos endósporos atingiu 100% no tempo de 30 minutos de exposição à temperatura máxima de 134°C e pressão absoluta de 2,3 kgf/cm², resultado obtido através da relação do número de micro-organismos recuperados considerados como inoculados e o número de micro-organismos sobreviventes ao tratamento. A 121°C houve recuperação de UFC após tratamento. A fração de ocupação não foi um fator delimitante para a inativação de endósporos, pois a temperatura se manteve a mesma independentemente da quantidade de resíduo submetido à autoclavagem. Um outro objetivo era avaliar experimentalmente a reprodução dos micro-organismos frente às condições operacionais de autoclavagem e do tempo de permanência do rejeito em condições ambientais. Esse estudo comprovou que a inativação nessas condições otimizadas esteriliza o resíduo, sendo que nenhum micro-organismo voltou a se reproduzir após dias expostos em temperatura ambiente, ou seja, não haveria riscos de contaminação em aterro sanitário quando depositados os rejeitos. Ter encontrado essas condições ideais e avaliado o processo de autoclavagem pode significar um grande avanço nas próprias unidades de tratamento, que terão um parâmetro estabelecido para trabalho.

Palavras-chave: Resíduos de Serviços de Saúde. *Geobacillus stearothermophilus*. Tratamento de resíduos por autoclave. Inativação microbiana. Desinfecção e esterilização de resíduos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. B. R. **Methodological proposal and evaluation of the inactivation of endospores of *Geobacillus stearothermophilus* in the treatment of healthcare waste by autoclaving**. 2017. 159 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Healthcare waste, even when treated and disposed of in landfills, can be causes of environmental impacts because they present some hazard indicator. According to appendix IV of Resolution of the National Health Surveillance Agency of Brazil (Anvisa) RDC nº 306/2004, for technologies of healthcare waste treatment, it is necessary to achieve at least Level III of microbial inactivation. The purpose of this research to optimize the process was defined taking into account the absence of data in the literature that revealed the optimal exposure time, temperature and pressure for microbial inactivation through the healthcare treatment by autoclaving and whether the fraction occupied by waste in the autoclave could interfere with the effectiveness of the disinfection. For the tests, endospores of *Geobacillus stearothermophilus* were used as bioindicators and five thermocouples were installed in the autoclave for temperature measurement throughout the chamber space. The healthcare waste was synthesized by characterizations such as gravimetric composition, granulometric distribution, apparent specific density, apparent specific mass and moisture content. A methodological proposal for the evaluation of waste treatment was introduced taking into consideration the difficulties encountered. Tests were performed at 116°C, 125°C and 134°C, observing the fraction of inactivation at six different exposure times. Since the sterilization of materials at 121°C is standardized in health establishments, even though no scientific studies were found to prove the sterilization efficiency in these conditions, tests were performed at 50 and 60 minutes of exposure to evaluate this condition. The concentration of 10^6 endospores were inoculated in the samples and the recovery was done with filtration after washing the waste, and the "pour plate" technique was used to count the colony forming units. The same procedure was done with the sample removed from the autoclave. The inactivation fraction of the endospores reached 100% in the time of 30 minutes of exposure to the maximum temperature of 134°C and absolute pressure of 2.3 kgf/cm², a result obtained by the ratio of the number of recovered microorganisms considered as inoculated and the number of microorganisms surviving the treatment. At 121°C there was recovery of colony forming units after treatment. The occupation fraction was not a limiting factor for the inactivation of endospores, since the temperature remained the same regardless of the amount of waste submitted to autoclaving. Another objective was to experimentally evaluate the reproduction of the microorganisms taking into consideration the operational conditions of autoclaving and the amount of time that the waste remains under environmental conditions. This study proved that the inactivation under these optimized conditions sterilizes the waste, and that no microorganism would reproduce again after days exposed at room temperature, therefore, there would be no risk of contamination in a landfill when the waste is deposited. Having found these ideal conditions and evaluated the autoclaving process can mean a major advance in the treatment units themselves, which will have an established parameter for work.

Keywords: Healthcare waste. *Geobacillus stearothermophilus*. Waste treatment by autoclave. Microbial inactivation. Disinfection and sterilization of waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 –	Destino final dos RSS coletados nos municípios em 2015	54
Figura 4.2 –	Papel cortado em tiras utilizado para compor a massa total de resíduos.....	74
Figura 4.3 –	a) Plástico filme triturado e b) plástico duro triturado.....	75
Figura 4.4 –	a) Papelão e tecido sendo misturados na massa total após terem sido cortados e b) isopor cortado	75
Figura 4.5 –	a) Luvas descartáveis cortadas e b) bexigas no formato canudo, ambos representando a massa de resíduos referente à borracha	76
Figura 4.6 –	a) Palitos de sorvete representando a madeira e b) lacres de latas de alumínio representando o metal	76
Figura 4.7 –	Vidro após ter sido quebrado manualmente ainda não misturado na massa total de resíduos	76
Figura 4.8 –	a) Os ossos de frango e b) a carne seca que compuseram o material	77
Figura 4.9 –	Homogeneização dos resíduos antecedente ao quarteamento	77
Figura 4.10 –	Resíduos sendo preparados para a segunda etapa do quarteamento.....	78
Figura 4.11 –	Recipiente com amostra encaminhada para análise granulométrica	78
Figura 4.12 –	a) Primeira etapa do quarteamento, b) segunda etapa do quarteamento e c) amostra homogeneizada conduzida ao peneiramento	79
Figura 4.13 –	Técnica de peneiramento	80
Figura 4.14 –	Saco hermético utilizado na armazenagem dos resíduos esterilizados.....	82

Figura 4.15 –	Volume de 1/3 de ocupação da câmara da autoclave.....	84
Figura 4.16 –	Amostras dos resíduos em sacos lacrados pela seladora.....	85
Figura 4.17 –	Frascos com tampa rosqueável contendo solução salina	85
Figura 4.18 –	Autoclave, termopares, indicador de temperatura e computador devidamente instalados para os testes com autoclavagem	86
Figura 4.19 –	Sistema de filtração	90
Figura 4.20 –	Placas de Petri incubadas após testes	91
Figura 4.21 –	a) Rompimento do saco de resíduos, b) recolhimento da solução, c) início da filtração, d) remoção da membrana, e) TSB sendo semeado em placa e f) finalização da técnica de “pour plate”	92
Figura 4.22 –	Avaliação da reprodução das bactérias após tratamento.....	93
Figura 5.23 –	Centrifugação das amostras de resíduos com 2% e 5% de umidade	96
Figura 5.24 –	Identificação da presença de colônia de fungos na placa de ensaio piloto	100
Figura 5.25 –	Placa contaminada por outras colônias	101
Figura 5.26 –	Membrana inutilizada por entupimento dos poros.....	101
Figura 5.27 –	Teste piloto com sistema de filtração.....	109
Figura 5.28 –	Placa com colônias de <i>G. stearothermophilus</i>	110
Figura 5.29 –	Placas de Petri referentes ao teste 18	110

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Primeiro teste de situação controle	97
Gráfico 5.2 – Segundo teste de situação controle	99
Gráfico 5.3 – Indicadores de temperatura na ocupação de 1/3 de autoclave	102
Gráfico 5.4 – Indicadores de temperatura na ocupação de 2/3 de autoclave	103
Gráfico 5.5 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 116°C nos seis testes realizados	104
Gráfico 5.6 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 121°C nos dois testes realizados	105
Gráfico 5.7 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 125°C nos seis testes realizados	105
Gráfico 5.8 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 134°C nos seis testes realizados	106
Gráfico 5.9 – Indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição a 116°C...	113
Gráfico 5.10 – Indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição a 125°C...	113
Gráfico 5.11 – Indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição a 134°C...	114
Gráfico 5.12 – Comparativos dos indicadores das frações de inativação nas condições estudadas	115
Gráfico A1 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 11	132
Gráfico A2 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 12	133

Gráfico A3 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 13.....	134
Gráfico A4 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 14.....	135
Gráfico A5 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 15.....	136
Gráfico A6 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 16.....	137
Gráfico A7 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 19.....	138
Gráfico A8 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 20.....	139
Gráfico A9 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 6.....	140
Gráfico A10 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 7.....	141
Gráfico A11 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 8.....	142
Gráfico A12 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 9.....	143
Gráfico A13 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 10.....	144
Gráfico A14 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 17.....	145
Gráfico A15 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 1.....	146
Gráfico A16 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 2.....	147
Gráfico A17 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 3.....	148
Gráfico A18 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 4.....	149
Gráfico A19 –	Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 5.....	150

Gráfico A20 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 18	151
--	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 –	Níveis de inativação microbiana.....	57
--------------	--------------------------------------	----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 4.1 – Etapas de caracterização do resíduo e métodos de trabalho.....	83
Fluxograma 4.2 – Representação da proposta metodológica dos testes com inativação microbiana frente aos objetivos da pesquisa	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Coleta de RSS no Brasil em 2015	44
Tabela 3.2 –	Composição gravimétrica dos RSS gerados no município (1997) e hospital (2010) de São Carlos	46
Tabela 3.3 –	Média da composição gravimétrica dos RSS gerados em centros cirúrgicos de dois hospitais de grande porte	47
Tabela 3.4 –	Composição gravimétrica dos RSS gerados na região de Ribeirão Preto	47
Tabela 3.5 –	Composição gravimétrica dos RSS do Grupo A gerados na UGRHI Pontal do Paranapanema	48
Tabela 3.6 –	Distribuição granulométrica dos RSS gerados na região de Ribeirão Preto..	48
Tabela 3.7 –	Capacidade instalada de tratamento de RSS no Brasil por regiões	55
Tabela 4.8 –	Comparativo da distribuição granulométrica fracionária de estudos com tratamento de RSS	81
Tabela 4.9 –	Organização dos 22 primeiros testes para busca da condição otimizada à inativação microbiana.....	89
Tabela 5.10 –	Fases do ciclo completo para “pacotes” e suas respectivas temperaturas, tempos de exposição e pressões absolutas.....	97
Tabela 5.11 –	Fases do ciclo completo para “teste biológico” e suas respectivas temperaturas, tempos de exposição e pressões absolutas	98
Tabela 5.12 –	Condições de exposição e tempo total da autoclavagem de cada teste	107
Tabela 5.13 –	Fração de inativação alcançada para cada condição estabelecida	111

Tabela 5.14 –	Teste de reprodução de <i>G. stearothermophilus</i> após o tratamento	116
---------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abrelpe	Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i> (Associação Americana de Saúde Pública)
CCCD	Coleção de Cultura Cefar Diagnóstica
Cetesb	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cnen	Comissão Nacional de Energia Nuclear
Conama	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EPI	Equipamento de Proteção Individual
NBR	Norma Brasileira aprovada pela ABNT
NE	Norma Experimental
PGRSS	Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
RSS	Resíduos de Serviços de Saúde
Sisnama	Sistema Nacional do Meio Ambiente
SMA	Secretaria do Meio Ambiente
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
STAATT	<i>State and Territorial Association on Alternative Treatment Technologies</i> (Associação Estadual e Territorial sobre Tecnologias Alternativas de Tratamento)
TSA	<i>Tryptone Soya Agar</i> (Agar Triptona de Soja)
TSB	<i>Tryptone Soya Broth</i> (Caldo Triptona de Soja)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
Unesp	Universidade Estadual Paulista
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USP

Universidade de São Paulo

UV

Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
bar	Unidade de pressão
°C	Graus Celsius
log	Logaritmo
N_0	Número de micro-organismos no instante inicial
N	Número de micro-organismos
kg	Quilograma
hab.	Habitante
m^3	Metro cúbico
in.	<i>Inches</i> ; polegada
mesh	Malha
t	Tonelada
sp.	Espécie
kgf	Quilograma-força
cm^2	Centímetro quadrado
W	Watt
Ln	Logaritmo Neperiano
e	Exponencial
k	Constante cinética de inativação microbiana
F	Força
M	Redução de log máximos atingíveis
$K_{0,T}$	Constante de velocidade de inativação
T	Temperatura
h	Expoente do modelo cinético de Hom
P	Pressão
MPa	Megapascal
t	Tempo de exposição
$D_{T,P}$	Redução decimal da temperatura em função da pressão
$D_{P,T}$	Redução decimal da pressão em função da temperatura
z_T	Resistência dos endósporos à temperatura
z_P	Resistência dos endósporos à pressão
m	Parâmetro do modelo cinético de Hom

c	Concentração de biocida
n	Ordem de reação do consumo de biocida
x	Ordem de reação de inativação microbiana
α	Parâmetro de escala
β	Parâmetro de forma
$\int$	Integral
$máx$	Máximo
k_0	Fator pré-exponencial de Arrhenius
E_a	Energia de ativação de Arrhenius
R	Constante universal dos gases ideais
μL	Microlitro
mL	Mililitro
cm^3	Centímetro cúbico
cm	Centímetro
L	Litro
N	Número de micro-organismos sobreviventes (UFC)
N_0	Número de micro-organismos inoculados (UFC)
Eq.	Equação
m	Metro
g	Gramma
min	Minuto
rpm	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	35
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
3.1	Os Resíduos de Serviços de Saúde.....	41
3.2	Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde	49
3.3	O tratamento dos RSS por autoclave.....	51
3.4	Inativação microbiana e os <i>Geobacillus stearothermophilus</i> como bioindicadores	56
3.5	Modelos cinéticos isotérmicos de inativação	63
3.6	Modelos cinéticos não-isotérmicos de inativação	69
4	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1	Equipamentos e acessórios	71
4.2	Procedimentos experimentais	73
4.2.1	Determinando a caracterização dos resíduos	73
4.2.2	Preparação do material para os ensaios	83
4.2.3	Fração volumétrica ocupada da câmara de autoclavagem.....	87
4.2.4	Diluição, plaqueamento e inoculação dos endósporos	87
4.2.5	Os testes de autoclavagem	88
4.2.6	A recuperação dos endósporos	89
4.2.7	Testes com reprodução dos micro-organismos após tratamento	92
4.2.8	Determinando a fração de inativação e proposta de aplicação do modelo cinético	94
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5.1	A caracterização dos RSS e suas influências na avaliação do tratamento	95
5.2	Etapas do procedimento de autoclavagem e monitoramento das temperaturas .	96
5.2.1	Observações quanto à preparação do material.....	99
5.3	Estudo da influência da fração volumétrica ocupada na câmara de autoclavagem	102

5.4	O comportamento da temperatura em função do tempo de exposição durante os processos de autoclavagem	103
5.5	Inoculação, recuperação e plaqueamento	107
5.5.1	Resultados e avaliação das frações de inativação	111
5.5.2	A reprodução das <i>G. stearothermophilus</i> após tratamento	115
6	CONCLUSÕES	119
7	RECOMENDAÇÕES	121
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICE A - GRÁFICOS OBTIDOS PELA RELAÇÃO TEMPERATURA E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DOS TESTES REALIZADOS	131
	ANEXO A - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DA AUTOCLAVE DE BANCADA UTILIZADA NO ESTUDO	154

1 INTRODUÇÃO

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), ainda que tratados e dispostos em aterros sanitários, podem ser causas de impactos ambientais por apresentarem algum fator de periculosidade. São classificados como perigosos, de acordo com a NBR 10004/2004 e também pela Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/2010), aqueles resíduos que em razão de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade, patogenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade, apresentam significativo risco à saúde pública ou à qualidade ambiental.

Segundo a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) RDC nº 306/2004, os RSS são classificados em cinco grupos: Grupo A, são os resíduos infectantes, Grupo B, formado pelos resíduos químicos, Grupo C, os com presença de radionucleotídeos em quantidade superior ao limite estabelecido, Grupo D, os resíduos comuns (recicláveis e não-recicláveis), e Grupo E, que são os perfurocortantes e escarificantes.

O sistema de tratamento é um conjunto de procedimentos que alteram as características físico-químicas e biológicas dos resíduos, descaracterizando-os, com os objetivos de minimizar o risco à saúde pública, a preservar o meio ambiente e manter a segurança e a saúde do trabalhador, conforme Anvisa (2006). Pode proceder em forma de destruição térmica, exemplos, incineração e pirólise; desinfecção, como a autoclavagem e desinfecção química; e, por radiação eletromagnética, exemplo, micro-ondas.

Para a Anvisa (2006), autoclavagem é a descontaminação com utilização de vapor em altas temperaturas e pressões. Utiliza o termo descontaminação ao invés de esterilização por considerar que a eficiência do tratamento se dá com 99,9% de inativação de micro-organismos, o que se opõe ao conceito de esterilização, que seria a morte de 100% dos seres vivos. Os valores usuais de pressão são da ordem dos 3 a 3,5 bar e temperaturas de aproximadamente 135°C. Diz-se que o tempo de contato deve ser suficiente para redução dos agentes patogênicos, de forma que não constitua risco. Quando cita temperaturas de 135°C não esclarece se é a ideal para o tratamento ou se é a máxima atingida pelo equipamento. O processo de autoclavagem inclui ciclos de compressão e de decompressão de forma a facilitar o contato entre o vapor e os resíduos, favorecendo a descontaminação. O tratamento é aplicado somente a RSS dos grupos A (com exceção dos subgrupos A₃ e A₅) e E.

Segundo a Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, Abrelpe (2016), a capacidade instalada de tratamento de RSS no Brasil empregam a autoclavagem (52,9% da capacidade instalada), incineração (31,4%) e aquecimento

dielétrico por exposição a micro-ondas (15,7%). Nota-se, portanto, que 68,6% da capacidade instalada utiliza técnicas de não-combustão que têm por objetivo principal a eliminação da carga de patógenos, praticamente sem envolver a transformação química dos materiais e substâncias presentes nos RSS. Tal capacidade instalada é dada sob a relação de toneladas de RSS tratados por ano.

Segundo o apêndice IV da Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, para as tecnologias de tratamento de resíduos de serviços de saúde, é necessário que se atinja pelo menos o Nível III de inativação microbiana. A Norma Técnica da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) E15.010/2011 regulamenta a avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente, por meio do teste com bioindicadores, que são: endósporos de *Bacillus atrophaeus* para os processos que utilizam calor seco e de *Geobacillus stearothermophilus* para processos com calor úmido. A norma configura apenas aspectos qualitativos das amostras, quanto à presença dos micro-organismos, sendo que os endósporos não podem ser quantificados, pois a metodologia empregada utiliza fitas ou tiras contendo populações mínimas de 10^4 endósporos que quando colocadas em meio de cultura específico apenas alteram sua cor na presença de micro-organismos, o que não permite a contagem após o teste.

O aquecimento dos resíduos em autoclave acontece em regime transiente não-isotérmico, ou seja, desde o início até o fim do processo a temperatura e pressão não se mantêm constantes. Durante o procedimento, o vapor é introduzido na autoclave e o aumento gradual da pressão favorece o contato entre o vapor e os resíduos (Anvisa, 2006).

Havia uma ausência de dados na literatura que revelassem o tempo de exposição, temperatura e pressão ideais para a inativação microbiana e não reprodução dos micro-organismos após tratamento extraestabelecimento. Além de avaliar essas condições, a presente pesquisa também analisou a influência da fração ocupada dos resíduos na autoclave, pois a porosidade do leito fixo formado pelas partículas do resíduo no interior do equipamento poderia interferir na penetração de vapor nos interstícios e consequentemente aumentaria a temperatura da amostra. Em Ministério da Saúde (2010), ao analisarem a autoclavagem de bolsas de sangue, notaram que a distribuição das bolsas dentro da autoclave e o grau de exposição direta ao calor úmido influenciaram diretamente na eficácia do tratamento. Macedo (2013) concluiu também que a variação da temperatura no interior da autoclave, constatada através de sensores térmicos, influenciou os resultados dos testes com autoclavagem de bolsas de sangue.

Hossain *et al.* (2012) constataram que o tratamento por autoclavagem de RSS com características infectantes não foi efetivo no sentido de atingir o Nível III de inativação microbiana. Utilizaram células vegetativas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis* mediante tempos de aquecimento de até 60 minutos e temperaturas do vapor na entrada no intervalo de 111°C a 131°C. Observaram o crescimento de bactérias em amostras de resíduos tratados após dois dias de armazenamento, o que tornou possível concluir que algumas das bactérias sobreviveram e se reproduziram após a desinfecção.

Uma vez comprovada a reprodução de células vegetativas dispersas em amostras de RSS típico, sendo a forma esporulada mais resistente ao estresse ambiental, a proposição do presente estudo consistiu em avaliar tecnicamente a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em RSS, sob as condições operacionais de tratamento de RSS extraestabelecimento semelhantes a equipamentos em escala real. A ausência de dados que comprovem a eficácia do processo de autoclavagem seguida da falta de condições pré-estabelecidas como tempo, temperatura e pressão de vapor, além da possibilidade de reprodução dos micro-organismos após tratamento foram os principais propósitos deste estudo.

Foi sugerida a utilização de modelos cinéticos em trabalhos futuros com o intuito de descrever adequadamente o comportamento obtido e permitir a simulação do processo de desinfecção. Revisando a literatura, percebe-se a escassez de pesquisas com aplicação de modelos cinéticos em autoclaves, que mostrem, tempo, temperatura e pressão associados à inativação microbiana.

Apesar de ser a tecnologia mais utilizada para tratamento de resíduos infectantes, o processo de tratamento por autoclave pode ser otimizado nas unidades, para atender maiores eficiências na inativação microbiana, eliminando o risco de contaminação em aterro sanitário. Ter atingido a fração de inativação de 100% comprovou que em condição ideal de esterilização (e não apenas desinfecção) os micro-organismos não se multiplicam.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar tecnicamente, sob a elaboração de uma proposta metodológica, a eficiência do processo de tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) por autoclave, que ocorre extraestabelecimento, para que a inativação microbiana seja atingida mediante condições de tempo, temperatura e pressão otimizadas, de forma que esse resíduo não ofereça risco de contaminação ao meio ambiente quando disposto em aterro sanitário.

2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste estudo:

- Elaborar uma proposta metodológica que permita avaliar o processo de autoclavagem de forma segura, confiável e que apresente resultados não somente qualitativos como quantitativos sobre a inativação de *Geobacillus stearothermophilus*.
- Quantificar os níveis de inativação microbiana em função das condições operacionais de temperatura, pressão, tempo de contato e fração volumétrica ocupada da câmara de autoclavagem.
- Avaliar experimentalmente a reprodução dos micro-organismos em RSS tratados frente às condições operacionais de autoclavagem e do tempo de permanência desse rejeito em condições ambientais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os itens a seguir definem os Resíduos de Serviços de Saúde no Brasil perante as resoluções regulamentadoras, mostram as formas de tratamento enfatizando a autoclavagem, retratam a inativação microbiana e apresentam pesquisas já desenvolvidas também com *Geobacillus stearothermophilus*. Além disso, descrevem modelos cinéticos utilizados para determinar a fração de inativação microbiana.

3.1 Os Resíduos de Serviços de Saúde

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) começaram a ser discutidos e regulamentados no Brasil já na década de 90, tendo em vista a importância de uma gestão e gerenciamento ambientalmente adequados para esses resíduos. Desde então, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) começou a publicar as primeiras versões de algumas normas específicas: NBR 12235/1992 que versa sobre o armazenamento de resíduos perigosos; NBR 12807/1993 define os termos empregados em relação aos RSS; NBR 12808/1993 classifica os RSS quanto aos riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública, para correto gerenciamento; NBR 12809/1993 fixa os procedimentos exigíveis para garantir condições de higiene e segurança no processamento interno de resíduos infectantes, especiais e comuns nos serviços de saúde; NBR 12810/1993 normatiza a coleta dos resíduos de serviços de saúde; NBR 13853/1997 estabelece as condições e métodos de ensaio para os coletores de resíduos de serviços de saúde perfurantes ou cortantes; NBR 7500/2000 que considera a identificação para o transporte terrestre, manuseio, movimentação e armazenamento de produtos perigosos; NBR 9191/2000 estabelece requisitos e métodos de ensaio para sacos plásticos de acondicionamento de resíduos; NBR 14652/2001 determina os requisitos mínimos de construção e de inspeção dos coletores-transportadores rodoviários de resíduos de serviços de saúde e NBR 14725/2001 trata sobre a ficha de informações de segurança, saúde e meio ambiente de produtos químicos. Os RSS ganharam destaque legal com a aprovação da Resolução do Conselho Nacional do Meio ambiente (Conama) nº 6 de 19/09/1991 que desobrigou a incineração ou qualquer outro tratamento com combustão de resíduos provenientes dos estabelecimentos de saúde e de terminais de transporte e concedeu a competência aos órgãos estaduais de meio ambiente para estabelecerem normas e procedimentos para sistemas de coleta, transporte, acondicionamento e disposição final dos resíduos nos estados e municípios. A Resolução Conama nº 283/01 discutiu o tratamento e

destinação final dos resíduos de serviços de saúde, não considerando os resíduos de terminais de transporte. Modificou o termo Plano de Gerenciamento de Resíduos da Saúde para Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Determinou responsabilidades e definiu os procedimentos gerais para o manejo dos resíduos a serem adotados na ocasião da elaboração do plano.

Consequentemente, a Anvisa publicou a Resolução – RDC nº 33 de 25 de Fevereiro de 2003 que regulamentava o gerenciamento de RSS no país.

A Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, atualmente em vigor, define como geradores de RSS todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal. Como exemplos: hospitais, laboratórios analíticos de produtos para saúde; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento; serviços de medicina legal; drogarias e farmácias inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e pesquisa na área da saúde; centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos, importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para diagnóstico *in vitro*; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura; serviços de tatuagem; clínicas e consultórios odontológicos; dentre outros similares.

Com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores, à preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente, o gerenciamento desses resíduos constitui um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas, técnicas, normativas e legais.

A Resolução do Conama nº 358/05, que revoga a Resolução Conama nº 283/01, trata do gerenciamento dos RSS no âmbito da preservação dos recursos naturais e do meio ambiente, na gestão extraestabelecimento. Promove a competência aos órgãos ambientais estaduais e municipais para estabelecerem critérios para o licenciamento ambiental dos sistemas de tratamento e destinação final dos resíduos, para Anvisa (2006). Entretanto, a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004 regulamenta a gestão intraestabelecimento no controle dos processos de segregação, acondicionamento, armazenamento, transporte, tratamento e disposição final. Define os procedimentos operacionais em função dos riscos envolvidos mantendo seu controle na inspeção dos serviços de saúde.

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) reúne o conjunto de diretrizes e ações a serem adotadas com vistas à gestão integrada e ao gerenciamento adequado dos resíduos sólidos, sendo instituída pela Lei nº 12.305/2010, que define RSS como aqueles gerados nos serviços de saúde, conforme definido em regulamento ou em normas

estabelecidas pelos órgãos do Sistema Nacional do Meio Ambiente (Sisnama) e do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). O Decreto nº 7.404/2010 regulamenta a Lei nº 12.305/2010, cria o Comitê Interministerial da Política Nacional de Resíduos Sólidos e o Comitê Orientador para a Implantação dos Sistemas de Logística Reversa. A PNRS tem como alguns dos objetivos, aplicáveis a RSS, a proteção da saúde pública e da qualidade ambiental; não geração, redução, reutilização, reciclagem e tratamento, bem como disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos; a minimização de impactos ambientais através da adoção, desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias limpas; redução do volume e da periculosidade dos resíduos perigosos e gestão integrada de resíduos sólidos.

A ABNT vem atualizando e revisando suas normas sobre gestão e gerenciamento de RSS. Seguem normas editadas:

- NBR 12809/2013, versa sobre o gerenciamento de RSS intraestabelecimento, que por seus riscos biológicos e químicos exigem formas de manejo específicas, como tratamento prévio, a fim de evitar riscos à saúde pública, principalmente do trabalhador, nesse caso, e ambiental;
- NBR 12807/2013, trata sobre terminologia em RSS apresentando uma lista de definições de 123 termos usados na área;
- NBR 12808/2016, normatiza a classificação dos RSS, após revisão técnica da edição anterior (NBR 12808/1993), quanto à sua natureza, riscos oferecidos à saúde pública e ambiental para gerenciamento adequado. Os RSS são classificados de acordo com a natureza do risco: biológico, químico, rejeito radioativo, perfurante e cortante, comum ou sem risco à saúde pública;
- NBR 12810/2016, trata sobre o gerenciamento de RSS extraestabelecimento, ou seja, fora do local de geração. Compreende coleta externa, transporte, tratamento e disposição final, também visando à contenção de riscos;
- NBR 16457/2016, normatiza a logística reversa de medicamentos de uso humano vencidos ou em desuso descartados pelo consumidor. Dá instruções quanto aos tipos de resíduos proibidos e permitidos de descarte.

Segundo a Abrelpe (2016), entre 2014 e 2015 houve uma redução de 1,8% na quantidade total de RSS coletados pelos municípios, com reflexo direto no índice per capita, o qual apresentou recuo de 2,6%. Defendeu-se que essa diminuição registrada pode ser atribuída à recessão econômica do país e à reestruturação dos serviços prestados pelos

municípios, que transferiram aos geradores a responsabilidade (incluindo custos) pela contratação da coleta e tratamento dos resíduos gerados pelos mesmos.

Acredita-se que a redução na quantidade de resíduos coletados também pode ser influência direta na minimização da geração. Isso se dá principalmente com o aumento da coleta seletiva, que de acordo com a Abrelpe (2016), em 2015 cerca de 70% dos municípios registraram tais atividades. Nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste foi bastante considerável esse avanço, mas nas regiões Sul e Sudeste mais de 85% dos municípios implementaram ações nesse sentido, um índice superior à média nacional.

Porém, sabe-se da problemática relacionada à inadequada segregação dos RSS que afeta diretamente num aumento dos resíduos comuns e minimização dos resíduos contaminantes. Em Abrelpe (2016) não foram citados os métodos de amostragem para alcance de tais diagnósticos.

Dados sobre a coleta de RSS no Brasil referente ao ano de 2015, de Abrelpe (2016), podem ser melhor observados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Coleta de RSS no Brasil em 2015

REGIÕES	População total	RSS coletado t/ano	Índice kg/hab./ano
Norte	17.472.636	9.826	0,562
Nordeste	56.560.081	36.862	0,652
Centro-Oeste	15.442.232	19.045	1,233
Sudeste	85.745.520	180.407	2,104
Sul	29.230.180	13.923	0,476
BRASIL	204.450.649	260.063	1,272

Fonte: Abrelpe (2016), adaptada pelo autor

Nota: Os índices por habitante foram calculados com base na população total dos municípios.

As resoluções Anvisa RDC n° 306/2004 e Conama n° 358/2005, classificam os RSS em cinco grupos, de acordo com os riscos oferecidos e por requererem formas específicas de manejo, sendo:

Grupo A: resíduos com a possível presença de agentes biológicos que podem oferecer risco de infecção. Resíduos desse grupo não podem ser reciclados, reutilizados ou reaproveitados. Dentro do Grupo A, há cinco subdivisões:

A₁: micro-organismos, resíduos de fabricação de produtos biológicos, descarte de vacinas, resíduos de laboratórios de manipulação genética, micro-organismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causadores de doença, bolsas transfusionais com sangue ou com hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação ou

com prazo de validade vencido, sobras de amostras de laboratórios com sangue ou líquidos corpóreos.

A₂ é o grupo de carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos à experimentação com micro-organismos, de acordo com a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004.

A₃ é constituído por membros de seres humanos e produtos de fecundação sem sinais vitais.

A₄ é formado por filtros de ar e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, sobras de amostras de laboratório e seus recipientes com fezes, urina ou secreções, resíduos de tecido adiposo e outros que não contenham sangue ou líquidos corpóreos na forma livre, para a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004.

A₅ é constituído por órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e outros materiais resultantes do atendimento à saúde de pessoas e animais, com suspeita de contaminação com príons.

Grupo B: resíduos químicos com características de corrosividade, reatividade, inflamabilidade, toxicidade, citogenicidade e explosividade. Segundo a Anvisa (2006), é o grupo que contém substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, resíduos de saneantes, desinfetantes, resíduos de metais pesados, reagentes para laboratório, inclusive os recipientes contaminados por esses, efluentes de processadores de imagens, efluentes dos equipamentos automatizados utilizados em análises clínicas e demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da Norma Brasileira, NBR 10.004/2004 aprovada pela ABNT.

Grupo C: rejeitos radioativos ou contaminados com radionuclídeos. Envolve materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionucléotídeos em quantidades superiores aos limites de eliminação, conforme a Norma Experimental da Comissão Nacional de Energia Nuclear 6.05 – NE/Cnen (ZEVZIKOVAS, 2006; Resolução Anvisa RDC nº 306/2004). Neste grupo, enquadram-se também materiais resultantes de laboratórios de pesquisa e ensino na área da saúde, laboratórios de análises clínicas e serviços de medicina nuclear e radioterapia que contenham radionucléotídeos. A Cnen define o gerenciamento e as regulamentações. Os rejeitos radioativos não podem ser considerados resíduos até que seja decorrido o tempo de decaimento necessário ao limite de eliminação. Depois de atingido o limite de eliminação, passam a ser considerados resíduos das categorias biológica, química ou

de resíduo comum e seguem as determinações do grupo ao qual pertencem. Não é permitida a reutilização desses materiais (Anvisa, 2006).

Grupo D: resíduos comuns, ou seja, aqueles com características similares aos resíduos domiciliares. Segundo a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, como papel de uso sanitário, fraldas, absorventes higiênicos, peças de vestuário, restos alimentares, equipo de soro e outros similares não classificados como Grupo A1, resíduos provenientes das áreas administrativas, resíduos de varrição, flores, podas e jardins e resíduos de gesso provenientes de assistência à saúde.

Grupo E: materiais perfurocortantes ou escarificantes, tais como lâminas de barbear, agulhas, escalpes, ampolas de vidro, brocas, limas endodônticas, pontas diamantadas, lâminas de bisturi, lancetas, lamínulas, e todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório (pipetas, tubos de coleta sanguínea e placas de Petri) e outros similares, (Resolução Anvisa RDC Nº 306/2004).

Andrade (1997) estabeleceu a composição gravimétrica dos RSS gerados no município de São Carlos no Estado de São Paulo. O mesmo foi feito por Pugliesi (2010), porém os resíduos analisados pertenciam a áreas não-críticas do Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Carlos. Segue a Tabela 3.2 que apresenta a composição gravimétrica feita no município e hospital de São Carlos.

Tabela 3.2 – Composição gravimétrica dos RSS gerados no município (1997) e hospital (2010) de São Carlos

COMPOSIÇÃO GRAVIMÉTRICA	Município de São Carlos em 1997	Hospital de São Carlos em 2010
Papel e papelão	40,25%	64,93%
Plástico	24,96%	14,43%
Metal	4,29%	9,00%
Vidro	9,29%	6,47%

Fonte: Andrade (1997) e Pugliesi (2010), adaptada pelo autor

Os índices de papel e papelão por Pugliesi (2010) foram relativamente mais altos, pois as coletas de RSS para composição gravimétrica foram feitas apenas na cozinha, administração e farmácia do hospital em estudo. Como base de cálculo para demonstração em tabela, foi feita uma média aritmética dos dados de geração obtidos nos três setores. É possível visualizar que não houve uma variação significativa na composição dos RSS.

Salomão *et al.* (2004) determinaram a composição gravimétrica de RSS do Grupo A em centros cirúrgicos de dois hospitais de grande porte (170 e 176 leitos), durante 14 dias

consecutivos. Estimaram que 80% dos resíduos gerados foram classificados como Grupo D, devido a grande presença de papel e plástico. A localização dos hospitais não foi citada pelos autores. Observa-se na Tabela 3.3 a proximidade dos valores encontrados através da caracterização dos resíduos nos hospitais.

Tabela 3.3 – Média da composição gravimétrica dos RSS gerados em centros cirúrgicos de dois hospitais de grande porte

COMPOSIÇÃO GRAVIMÉTRICA	HOSPITAL A (%)	HOSPITAL B (%)	MÉDIA (%)
Papel	36,8	43,8	40,3
Plástico	19,7	22,1	20,9
Borracha	4,4	13,4	8,9
Tecido	13,2	12,8	13,0
Vidro	2,8	1,2	2,0
Matéria orgânica	14,4	6,0	10,2
Outros	8,7	0,7	4,7

Fonte: Salomão *et al.* (2004), adaptada pelo autor

No estudo de Oliveira *et al.* (2010), a composição gravimétrica para testes de inativação microbiana com *Bacillus atrophaeus* foi obtida por meio da massa representativa de 2 kg de resíduos. Segue a Tabela 3.4 com a caracterização dos RSS gerados em municípios da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

Tabela 3.4 – Composição gravimétrica dos RSS gerados na região de Ribeirão Preto

MATERIAL	% EM MASSA (BASE SECA)
Papel/Tecido	39,3
Plástico duro	24,7
Plástico filme	13,2
Borracha	10,5
Metais	4,4
Vidro	2,1
Ossos	1,6
Madeira	1,1
Espuma de poliestireno	0,6
Outros materiais de difícil segregação	2,6
TOTAL	100
Densidade da massa para 50% de umidade (base úmida)	128 kg/m ³

Fonte: Oliveira *et al.* (2010)

Ferreira (2013) analisou a composição gravimétrica dos RSS gerados por estabelecimentos de saúde de 19 municípios da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (URGHI) do Pontal do Paranapanema, localizada na bacia hidrográfica do Rio

Paraná, no extremo oeste do Estado de São Paulo. Os RSS caracterizados pertenciam aos grupos A, B e D. A Tabela 3.5 apresenta a composição gravimétrica dos RSS pertencentes ao Grupo A, dos 19 municípios. Os resíduos do Grupo E, que também podem ser contaminados biologicamente, não foram caracterizados.

Tabela 3.5 – Composição gravimétrica dos RSS do Grupo A gerados na URGHI Pontal do Paranapanema

COMPOSIÇÃO GRAVIMÉTRICA	GRUPO A (%)
Plástico	18,1
Papel	14,4
Vidro	0,5
Madeira	1,2
Borracha	42,5
Tecido	22,8
Tecido humano	0,5
TOTAL	100

Fonte: Ferreira (2013), adaptada pelo autor

Para Oliveira *et al.* (2010), a distribuição por tamanho das partículas foi determinada e os dados são apresentados na Tabela 3.6. Para determinação do tamanho das partículas dos RSS é feita a distribuição granulométrica pelo método de peneiramento.

Tabela 3.6 – Distribuição granulométrica dos RSS gerados na região de Ribeirão Preto

Malha de rede	Tamanho (mm)	% em massa
>1.5 in.	38,100	21,3
1.5–1.25 in.	31,700	0,7
1.25–1 in.	25,400	3,4
1–0.75 in.	19,100	11,9
0.75–0.5 in.	12,700	16,2
0.5–0.375 in.	9,520	12,2
0.375–0.25 in.	6,350	13,6
0.25 in. – 6 mesh	3,350	12,2
6–8 mesh	2,360	3,3
8–16 mesh	1,000	4,1
16–28 mesh	0,600	0,6
28–32 mesh	0,500	0,2
32–45 mesh	0,350	0,1
45–80 mesh	0,177	0,2
80–100 mesh	0,150	0,2
<100 mesh	0,130	0,0

Fonte: Oliveira *et al.* (2010)

Estabelecida na gestão integrada dos resíduos, a caracterização é a etapa inicial do manejo, pois torna possível a segregação adequada, o acondicionamento diferenciado, a

coleta, o transporte, o tratamento e a disposição final adequados. É instrumento básico de gerenciamento, de primordial importância para o controle das situações risco derivadas do manejo inadequado destes, influenciando todas as etapas envolvidas, segundo Schneider *et al.* (2001).

Os RSS representam um potencial de risco em duas situações: para a saúde ocupacional de quem os manipulam, tanto ao profissional ligado à assistência médica ou médico-veterinária, quanto ao setor de limpeza e manutenção; e para o meio ambiente, como decorrência da destinação inadequada de um resíduo, alterando as características do meio (Anvisa, 2006).

Contudo, é necessário que o governo aprimore suas respectivas legislações e fiscalize rigorosamente o gerenciamento dos resíduos nos estabelecimentos geradores, pois o descarte de RSS em lugares inapropriados (lixões e aterros não licenciados), assim como o descarte de resíduos que não receberam o devido tratamento, podem ocasionar riscos ao meio ambiente. Para Abrelpe (2013), apesar do seu potencial infectante, a gestão de RSS não registrou avanços que mereçam destaque nestes dez últimos anos. As quantidades de resíduos coletados e destinados corretamente pelos municípios não acompanharam o crescimento populacional. É possível perceber que o país está evoluindo a passos bastante lentos no estabelecimento de uma gestão integrada e sustentável de resíduos sólidos e no cumprimento das determinações da Política Nacional de Resíduos Sólidos, que através da Lei 12.305/2010, prevê a prevenção e a redução na geração de resíduos, prática de hábitos de consumo sustentável, o aumento da reciclagem e da reutilização dos resíduos sólidos e a destinação ambientalmente adequada dos rejeitos (aquilo que não pode ser reciclado ou reutilizado).

3.2 Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde

Segundo a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004 é dever de todo gerador a elaboração do Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) baseado nas características e classificação dos resíduos gerados para determinação das diretrizes ambientalmente adequadas de manejo. A responsabilidade técnica para a elaboração e implantação do plano pode ser assessorada por um coordenador de execução de PGRSS ou responsável técnico do estabelecimento.

Conforme a Anvisa (2006), o PGRSS é um documento que contempla o manejo dos resíduos e todas suas etapas, no âmbito dos estabelecimentos, bem como as ações de proteção

à saúde pública e ao meio ambiente. Deve ser compatível com as normas locais relativas à coleta, transporte e disposição final dos resíduos gerados nos serviços de saúde.

Para Anvisa (2006), são etapas a serem contempladas no plano, na sequência:

- dados gerais do estabelecimento;
- responsabilidades;
- caracterização do estabelecimento;
- classificação, segregação e acondicionamento dos RSS;
- estudo de caso com dados de indicadores de geração;
- cronograma das atividades;
- coleta e transporte interno;
- armazenamento temporário;
- armazenamento para a coleta externa dos RSS;
- gestão extraestabelecimento: tratamento e disposição final;
- capacitação dos profissionais;
- controle de insetos de roedores;
- segurança ocupacional;
- riscos oferecidos pelos RSS;
- situação de emergência e acidentes.

Deve-se considerar as características e riscos dos resíduos, as ações de proteção à saúde e ao meio ambiente e os princípios da biossegurança de empregar medidas técnicas administrativas e normativas para prevenir acidentes, contemplando medidas de envolvimento coletivo, segundo a Anvisa (2006). É necessário que o planejamento do programa seja feito em conjunto com todos os setores definindo-se responsabilidades e obrigações de cada um em relação aos riscos.

De acordo com a PNRS, Lei nº 12.300/2006, compete ao gerador a prevenção da poluição ou redução na fonte, a minimização dos resíduos gerados, a reutilização e reciclagem de forma ambientalmente correta, seguindo os princípios de poluidor-pagador estabelecidos pela política.

No estudo de Ribeiro (2010), a elaboração do PGRSS levou em consideração as diretrizes estabelecidas na Resolução Anvisa RDC nº 306/2004. Essas nortearam a estrutura do plano baseada em: caracterizar o hospital em estudo, estabelecer as rotinas a serem alteradas de forma a melhorar a eficiência do trabalho, aprimorar o conhecimento dos profissionais, valorizando a segurança ocupacional, incentivar a segregação dos resíduos

recicláveis, estabelecendo responsabilidades dentro dos serviços realizados, propondo um manejo de RSS correto, dando importância à gestão extraestabelecimento, ao controle de insetos e roedores e ao cuidado com os riscos oferecidos nas tarefas diárias.

Ferreira (2013) analisou as atividades de gestão e gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 22, Pontal do Paranapanema - SP. Quanto ao gerenciamento interno dos RSS gerados nos estabelecimentos, constatou-se uma média de 15% de resíduos considerados comuns (Grupo D) junto aos infectantes (Grupo A). Porém, o aspecto relevante quanto ao cumprimento da Resolução Anvisa RDC nº 306/04 foi que 97,4% dos estabelecimentos não possuíam o PGRSS. Entretanto, os municípios que o possuíam, não contemplavam todo o conteúdo preconizado na legislação. E 36,3% dos que informaram não possuir o plano alegaram como justificativa a falta de conhecimento técnico, de capacitação e de diretrizes para a sua elaboração, sendo também observada a falta de infraestrutura para cumprimento das normas técnicas.

“O PGRSS deve ser utilizado como uma ferramenta gerencial, uma vez que proporciona a integração entre as atividades operacionais e propõe, ainda, o monitoramento do sistema por meio de indicadores de desempenho” (PUGLIESI, 2010, p. 138).

3.3 O tratamento dos RSS por autoclave

De acordo com a Anvisa (2006), o tratamento é a aplicação de técnicas e processos que reduzem ou eliminem o risco de contaminação oferecido pelos resíduos, tanto nos acidentes ocupacionais como danos ao meio ambiente. Pode ser realizado por processos manuais, mecânicos, físicos, químicos ou biológicos que alterem as características dos resíduos, de forma a minimizar o risco à saúde, preservar a qualidade do meio ambiente, a segurança e a saúde do trabalhador. Pode ser feito no estabelecimento gerador ou em outro local, observadas, nestes casos, as condições de segurança para o transporte entre o estabelecimento gerador e o local do tratamento. São definidos os termos intra e extraestabelecimento, pois alguns resíduos devem receber tratamento antes de serem coletados. De acordo com a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004 são os RSS do Grupo A₁.

Para Anvisa (2006), os sistemas para tratamento de RSS devem ser objeto de licenciamento ambiental, de acordo com a Resolução Conama nº 237/97 e são passíveis de fiscalização e de controle pelos órgãos de vigilância sanitária e de meio ambiente.

Ainda que tratados, depois de dispostos em aterros sanitários, os RSS podem ser causas de impactos ambientais por apresentarem algum indicador de periculosidade. São

classificados como perigosos, de acordo com a NBR 10004/2004 e também com a PNRS (Lei 12.305/2010), aqueles resíduos que em razão de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade, patogenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade, apresentam significativo risco à saúde pública ou à qualidade ambiental. A classificação de resíduos envolve a identificação do processo ou atividade que lhes deu origem, a identificação de seus constituintes e características. Em seguida, a comparação dos dados obtidos com listagens de resíduos e substâncias cujo impacto à saúde e ao meio ambiente é conhecido. Para isso é necessário o uso das normas: NBR 10005/2004, que determina o procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos; NBR 10006/2004, estabelece o procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos, objetivando tornar uma amostra de um resíduo sólido solúvel em água para análise dos elementos presentes no extrato; NBR 10007/2004, detalha a metodologia utilizada na amostragem de resíduos sólidos, a ser analisada como representativa do todo.

Segundo a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, os RSS, classificados como perigosos, antes de serem dispostos em aterros devem ser tratados. No caso desses resíduos, o sistema de tratamento é um conjunto de procedimentos que alteram as características físico-químicas e biológicas dos resíduos, descaracterizando-os, com os objetivos de minimizar o risco à saúde pública, a preservar o meio ambiente e manter a segurança e a saúde do trabalhador.

O tratamento pode proceder em forma de:

- destruição térmica, quando os resíduos são submetidos a temperaturas mínimas de 800°C, o que ocasiona a transformação física e consequente descontaminação do material, conforme a Resolução Conama nº 316/2002, exemplos, incineração e pirólise;
- desinfecção, processo no qual o número de micro-organismos é reduzido ou eliminado quando expostos às temperaturas e pressões elevadas ou às substâncias químicas, como a autoclavagem e desinfecção química;
- radiação eletromagnética, que através da propagação das ondas de alta frequência permite a modificação ou destruição celular, exemplo, micro-ondas.

A utilização de micro-ondas tem uma tecnologia mais recente que descontamina os resíduos através da emissão de ondas que promovem o aumento de temperatura, chegando entre 95 e 105°C. Antes de serem tratados, os resíduos passam por processos de trituração e umidificação.

Para a Anvisa (2006), autoclavagem é a descontaminação com utilização de vapor em altas temperaturas e pressões. Utiliza o termo descontaminação ao invés de esterilização

por considerar que a eficiência do tratamento se dá com 99,9% de inativação de micro-organismos, o que se opõe ao conceito de esterilização, que seria a morte de 100% dos seres vivos. Os valores usuais de pressão são da ordem dos 3 a 3,5 bar e temperaturas de aproximadamente 135°C. Diz-se que o tempo de contato deve ser suficiente para redução dos agentes patogênicos, de forma que não constitua risco. Quando cita temperaturas de 135°C não esclarece se é a ideal para o tratamento ou se é a máxima atingida pelo equipamento. O processo de autoclavagem inclui ciclos de compressão e de decompressão de forma a facilitar o contato entre o vapor e os resíduos, favorecendo a descontaminação. Esse tratamento é aplicado somente a RSS dos grupos A (com exceção dos subgrupos A₃ e A₅) e E.

De acordo com Anvisa (2006), o tratamento por autoclavagem aborda as seguintes fases:

- pré-vácuo inicial: criam-se condições de pressões negativas para que na fase seguinte o vapor entre em contato com os resíduos;
- admissão de vapor: introdução de vapor na autoclave e aumento gradual da pressão favorecendo o contato entre o vapor e os resíduos, destruindo os invólucros que impedem o acesso do vapor às superfícies;
- exposição: manutenção de temperaturas e pressões elevadas durante um determinado período de tempo para a descontaminação.

Para Anvisa (2006), o tempo e a temperatura de cada ciclo são definidos de acordo com a carga a ser tratada. Nada é dito sobre as características dessa carga, se são dadas de acordo com o peso ou característica do resíduo, o que indica a ausência de dados concisos.

Na exaustão lenta, o vapor passa gradativamente por um filtro poroso com uma malha suficientemente fina que impede a passagem de micro-organismos para o exterior da autoclave. A pressão chega a 1 atmosfera. Ocorre uma redução da carga até uma temperatura viável para a retirada dos resíduos da autoclave.

Todo o processo de tratamento deve ser licenciado e fiscalizado por órgão ambiental competente.

Depois de tratados por autoclave, os RSS dos grupos A e E devem ser encaminhados para aterro sanitário. A disposição dos resíduos no solo deve ser feita obedecendo aos critérios técnicos de construção e operação do aterro, que por sua vez, deve estar licenciado ambientalmente, conforme a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004. O resíduo, depois de tratado, segue para aterro sanitário, isso quando a legislação pertinente é obedecida.

De acordo com a NBR 12810/2016, resíduos tratados por processos sem combustão cuja disposição não seja feita em células exclusivas devem estar triturados.

A trituração pode ser prévia ao tratamento o que aumenta a superfície de contato e facilita a eficiência da esterilização. Realizada pós-tratamento tem apenas o objetivo de descaracterização do rejeito e menor ocupação de espaço em células.

Os efluentes líquidos gerados pelo sistema de autoclavagem podem necessitar de tratamento, pois devem atender aos limites de emissão dos poluentes estabelecidos na legislação ambiental vigente, antes de seu lançamento em corpo de água ou rede de esgoto, (Anvisa, 2006).

Segundo dados da Abrelpe (2016), quanto à disposição final dos RSS, entende-se que 29,9% dos municípios brasileiros ainda descartam RSS em aterros sanitários, valas sépticas e lixões sem qualquer tratamento prévio. O Gráfico 3.1 ilustra o destino final dos RSS coletados nos municípios pesquisados no ano de 2015. Os tipos de tratamentos empregados no Brasil são: tratamento por micro-ondas, autoclavagem e incineração.

Figura 3.1 – Destino final dos RSS coletados nos municípios em 2015

Fonte: Abrelpe (2016), adaptada pelo autor

A autoclavagem é a técnica para tratamento dos resíduos infectantes mais utilizada em comparação com o tratamento por micro-ondas, pois 21,9% dos RSS gerados em 2015 foram encaminhados para autoclave e apenas 2,5% para micro-ondas. A incineração continua sendo a tecnologia mais utilizada de um modo geral.

Segundo a Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, Abrelpe (2016), a capacidade instalada de tratamento de RSS no Brasil empregam a autoclavagem (52,9% da capacidade instalada), incineração (31,4%) e aquecimento

dielétrico por exposição a micro-ondas (15,7%). Nota-se, portanto, que 68,6% da capacidade instalada utiliza técnicas de não-combustão que têm por objetivo principal a eliminação da carga de patógenos, praticamente sem envolver a transformação química dos materiais e substâncias presentes nos RSS. Tal capacidade instalada é dada sob a relação de toneladas de RSS tratados por ano. A Tabela 3.7 mostra essa capacidade instalada de tratamento de RSS no Brasil por regiões.

Tabela 3.7 – Capacidade instalada de tratamento de RSS no Brasil por regiões

REGIÕES	Capacidade instalada (t/ano) x Tecnologia			
	Autoclave	Micro-ondas	Incineração	TOTAL
Norte	-	-	4.818	4.818
Nordeste	34.310	-	32.375	66.685
Centro-Oeste	6.570	-	32.850	39.420
Sudeste	114.865	54.385 (*)	41.062	210.313
Sul	36.573	2.555	2.920	42.048
BRASIL	192.318	56.940	114.025	363.283

* A estes dados foram somadas 100 t/dia, referente à Desativação Eletrotérmica no Estado de São Paulo.

Fonte: Abrelpe (2016), adaptada pelo autor

A eficiência do processo de autoclavagem depende da temperatura, pressão, tempo de exposição e contato direto com o vapor, além da densidade do resíduo, segundo Ribeiro (2008), que em seu estudo concluiu que esse tratamento é um processo eficiente de baixo custo operacional, porém, essa não sendo uma alternativa única para tratamento de RSS e devendo se considerar alternativas que sejam resultado de adequações a cada situação. Para isso é necessário uma gestão adequada dos RSS, para que se conheçam todas as características dos resíduos, instalações hospitalares, os caminhos que esses percorrem, entre outros. Dentre as desvantagens do processo, destacou-se que o peso dos resíduos não se altera e os resíduos não são descaracterizados, embora sejam inativados biologicamente. Ribeiro (2008) não levou em consideração que a massa de resíduos aumenta após o processo de tratamento devido à alteração da umidade do resíduo e que feita a trituração do rejeito para disposição em aterro sanitário o material será descaracterizado.

Em Dalles (2012), uma avaliação da periculosidade de RSS tratados por autoclavagem constatou a presença de substâncias não-voláteis, como o mercúrio, o que caracteriza o resíduo como perigoso. Isso mostra que a inadequada segregação, ocorrida intraestabelecimento, influencia diretamente a qualidade do tratamento e consequentemente pode contaminar o aterro sanitário. Para Ribeiro e Pisani Jr. (2012), variações nos indicadores de geração de RSS em um hospital de pequeno porte no município de Altinópolis (SP) justificaram a inadequada segregação dos resíduos. Chegou a ser nula a geração de resíduos

do Grupo B, que não estavam sendo segregados separadamente dos resíduos do Grupo A, o que estaria ocasionando uma perda no tratamento desse resíduo, conforme era destinado. Os resíduos dos grupos A, B e E eram caracterizados no abrigo de resíduos do hospital em estudo e quantificados em seus respectivos grupos, mesmo esses estando acondicionados de forma incorreta. Com isso, obtiveram tanto indicadores do valor bruto de geração de RSS, ou seja, aquele que realmente existia de acordo como estava acondicionado, quanto indicadores do valor de geração de RSS depois de caracterizado e quantificado. Houve variações nas gerações de resíduos, nos grupos A, B e E, bruto e reclassificado, que justificaram a má segregação dos resíduos.

O irregular gerenciamento dos RSS pode caracterizar um desequilíbrio de caráter epidemiológico, devido ao potencial de infecção conhecido; porém esse tema vem gradativamente tornando-se um assunto de interesse mundial pelo possível impacto ambiental quando há uma destinação inadequada desses resíduos (SOUZA, 2005).

Souza (2005) alerta que se não houver a preservação da água nos arredores do aterro sanitário com precauções legalmente estabelecidas, esta pode transformar-se em um excelente veiculador de patógenos. Defende que são medidas de prevenção e minimização da contaminação do meio ambiente: a educação ambiental; a redução da geração de resíduos contaminados, através do incentivo à reciclagem e reutilização dos resíduos comuns (Grupo D), o manejo eficiente dos RSS e o combate ao descarte inadequado dos RSS em lixões, ou mesmo em aterros sanitários sem tratamento prévio.

3.4 Inativação microbiana e os *Geobacillus stearothermophilus* como bioindicadores

Na pesquisa de Andrade (1997), foram apresentados dados como as características físicas, químicas e microbiológicas dos RSS produzidos em áreas críticas, semicríticas e não-críticas de unidades de saúde do município de São Carlos, interior do Estado de São Paulo. Em suas análises microbiológicas, foi constatada a presença dos seguintes micro-organismos nos RSS gerados no município: *Escherichia coli*, *Serratia* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp.; sendo a maioria das bactérias encontradas patogênicas, uma vez que não foram identificadas as espécies do gênero *Bacillus*.

Silva *et al.* (2002) identificaram e avaliaram os aspectos ambientais e epidemiológicos, relacionados aos micro-organismos patogênicos presentes nos resíduos dos grupos A e E, os infectantes. Participaram da pesquisa profissionais da área de infectologia,

epidemiologia e microbiologia ambiental. A formação multidisciplinar dos especialistas, favoreceu o processo de avaliação consensual sobre os critérios adotados na seleção dos indicadores. No grupo de patógenos avaliados como indicadores destacaram-se as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*, Enterococos (ou *Streptococcus faecalis*), *Staphylococcus aureus*, *M. tuberculosis* e os vírus da Hepatite A e B. A pesquisa objetivou destacar os indicadores de maior ou menor importância na contaminação ambiental. Pelos dados observados, verificou-se que a ocorrência de doenças infecciosas associadas a esses resíduos deveu-se a agentes encontrados na microbiota normal humana e a patógenos, e diferentes micro-organismos patogênicos apresentaram capacidade de persistência ambiental. O trabalho destacou os diferentes níveis de riscos à exposição biológica quando ocorre um gerenciamento inadequado de RSS, no caráter intra e extraestabelecimento de saúde.

A redução da carga microbiana consiste na aplicação do processo que visa à inativação microbiana das cargas biológicas contidas nos resíduos, para Anvisa (2006). Diminuir os riscos à saúde pública e ambiental é um dos principais norteadores do gerenciamento dos RSS. Para tanto, a inativação dos micro-organismos serve como parâmetro para avaliação da eficiência do tratamento desses resíduos.

Segundo o apêndice IV da Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, para as tecnologias de tratamento de resíduos de serviços de saúde, é necessário que se atinja pelo menos o Nível III de inativação microbiana, descrito no Quadro 3.2.

Quadro 3.1 – Níveis de inativação microbiana

Nível I	Inativação de bactérias vegetativas, fungos e vírus lipofílicos com redução igual ou maior que 6.log10.
Nível II	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6.log10.
Nível III	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6log10, e inativação de esporos do <i>B. stearothermophilus</i> ou de esporos do <i>B. subtilis</i> com redução igual ou maior que 4.log10.
Nível IV	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, e inativação de esporos do <i>B. stearothermophilus</i> com redução igual ou maior que 4.log10.

Fonte: STAATT (1998) e Resolução Anvisa RDC nº 306/2004

Para estudos e determinação do nível de inativação microbiana, são isoladas bactérias comuns aos RSS e resistentes aos tratamentos térmicos sem combustão. Essas são chamadas bioindicadores e se apresentam na forma de endósporos, estruturas formadas por

bactérias gram-positivas quando o meio se torna carente de água ou de nutrientes essenciais, sendo desfavorável à sobrevivência do micro-organismo. É um tipo de diferenciação celular chamada esporogênese que ocorre dentro da célula vegetativa, segundo Trabulsi e Alterthum (2004). São estruturas dormentes, resistentes, não-reprodutivas.

No tratamento térmico com autoclave, o bioindicador utilizado para testes de inativação microbiana é a bactéria *Geobacillus stearothermophilus*. De acordo com De Vos *et al.* (2009), *Bacillus stearothermophilus* foi por um longo período considerada como a única termofílica obrigatória, por isso a proposta de um novo gênero, *Geobacillus*, que após vários estudos taxonômicos com bacilos termofílicos aeróbios, micro-organismos que vivem a altas temperaturas e utilizam oxigênio na respiração, foram assim descritas também por Nazina *et al.* (2001). Erroneamente alguns autores ainda consideram tal espécie como pertencente ao gênero *Bacillus*.

Segundo Nazina *et al.* (2001), esses micro-organismos gram-positivos possuem grandes quantidades de ácidos graxos em seus envoltórios, que podem ser fatores que garantem resistência ao ser vivo. Porém pouco se sabe como as camadas lipoproteicas da membrana celular dessas bactérias resistem às altas temperaturas, segundo De Vos *et al.* (2009). Essas bactérias utilizam maltose e hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia.

Para Dworkin *et al.* (2006), as bactérias *Geobacillus stearothermophilus* crescem a 65°C e pH menor que 6,0. Suas membranas contêm uma camada S, que consiste em dois tipos de cadeias de glicano, sendo um único tipo de ligação proteína-carboidrato, o que levou a defenderem que a camada S pode ter um papel chave nas interações de bactéria-metal.

O grau de resistência ao calor não depende só das espécies, mas também sobre o ambiente fisiológico no qual os endósporos foram formados, conforme Dworkin *et al.* (2006). De acordo com De Vos *et al.* (2009), as *G. stearothermophilus* constituem o maior grupo de bactérias termófilas obrigatórias e habitam solo, águas termais, deserto de areia, as águas do Ártico, sedimentos oceânicos, alimentos e compostos orgânicos.

Tortora (2012), por meio de testes na indústria alimentícia, explica que enquanto a maioria das células vegetativas são mortas a temperaturas acima de 70°C, os endósporos de bactérias termofílicas têm uma resistência maior, podendo sobreviver por 19 horas em água fervente ou até em condições anaeróbias. A deterioração termofílica anaeróbica pode ser realizada por *Geobacillus stearothermophilus*, uma causa bastante comum de deterioração de alimentos enlatados de baixa acidez. Essas bactérias são encontradas no amido e açúcares.

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), após testes com inativação microbiana em bolsas de sangue, pode-se afirmar que os endósporos de *G. stearothermophilus* são mais

resistentes ao calor úmido de um ciclo de inativação do que os vírus da Hepatite B, podendo assim continuar a serem usados como bioindicadores para o monitoramento desse tipo de tratamento.

Fraiha *et al.* (2010) objetivaram determinar os parâmetros de destruição térmica dos endósporos de *G. stearothermophilus* e estimar suas dimensões. Os endósporos suspensos em solução salina e em mistura de grãos de milho e soja moídos foram submetidos ao calor por tempo variável, seguido de incubação e contagem direta. As amostras foram desidratadas e visualizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura. Os resultados confirmaram a elevada resistência térmica do endósporo, classificando-o como um bom indicador biológico para avaliação do processo de extrusão como esterilizante de alimentos. O tempo de resistência do material na extrusora e a temperatura do processo variaram de 60 a 150 segundos, e de 80 a 140°C, respectivamente.

A Norma Técnica da Cetesb E15.010/2007 regulamenta a avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente, através do teste com bioindicadores, que são: endósporos de *Bacillus atrophaeus* para os processos que utilizam calor seco e de *Geobacillus stearothermophilus* para processos com calor úmido. Porém, tal norma configura apenas aspectos qualitativos das amostras, quanto à presença dos micro-organismos, sendo que os endósporos visualizados não podem ser quantificados, diferentemente da até então vigente, a Norma Técnica P2.111/2007, na qual os endósporos eram contados. A metodologia empregada utiliza fitas ou tiras contendo populações mínimas de 10^4 endósporos que quando colocadas em meio de cultura específico apenas alteram sua cor na presença de micro-organismos, o que não permite a contagem dos endósporos após o teste.

A Norma Técnica P2.111/2007 sugeria uma avaliação do tratamento por calor úmido através da utilização de ampolas ou frascos. Os endósporos seriam inoculados diretamente nesses recipientes e submetidos a tratamento. Para cada teste teria uma situação controle. Em seguida era feito o plaqueamento, por “pour plate”, e as placas incubadas a 60°C por 48 horas para posterior contagem. Acredita-se na inviabilidade de 48 horas de incubação, pois devido à alta temperatura considerada como ideal para reprodução desses micro-organismos, tal tempo danificaria o meio de cultura das placas e impossibilitaria a contagem. Essa norma não simulava o comportamento e a inativação dos micro-organismos de maneira igualável com a real, na qual o objeto de estudo é o tratamento do resíduo.

Sabe-se que a desinfecção dos resíduos contaminados biologicamente deve atingir o Nível III de inativação microbiana. Essa inativação é comprovada pela redução superior a 4 e

6 logs das concentrações de endósporos dessas bactérias. É objetivo da Norma Técnica da Cetesb E15.010/2011 estabelecer os procedimentos necessários para a realização do teste de avaliação da eficiência dos sistemas de tratamento térmico, por exemplo, micro-ondas e autoclave.

Em Pisani Jr. *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2010) e Iannotti e Pisani Jr. (2013), testes com células vegetativas de *Pseudomonas aeruginosa* e endósporos de *Bacillus atrophaeus* não obtiveram os 99,99% de inativação prevista nas resoluções, quando submetidas a tratamento por micro-ondas. Mesmo variando os níveis de temperatura, tempo de exposição e potência, foi possível concluir que a técnica de inativação de endósporos em RSS pode ser efetiva, desde que as condições operacionais sejam bem estabelecidas, ou desde que haja outro tratamento concomitante para a desinfecção.

Pisani Jr. *et al.* (2008) inocularam micro-organismos da espécie *Pseudomonas aeruginosa* na forma vegetativa para o tratamento com micro-ondas. A umidade de entrada da massa do resíduo foi de 50% em base úmida. O tempo de exposição à radiação de 117 minutos foi requerido para se obter o nível de inativação 6.log 10 para os resíduos processados a 100 W/kg e à temperatura de 100°C. O tempo de exposição à radiação se mostrou mais influente na fração de inativação que a potência por unidade de massa de resíduo nas condições estudadas.

No estudo de Oliveira *et al.* (2010) a suspensão de endósporos de *Bacillus atrophaeus* foi inoculada diretamente no interior da massa de resíduo de RSS para desinfecção por micro-ondas. Os resultados foram descritos por modelos cinéticos. A fração de inativação foi de 71% obtida com uma potência de 200 W/kg e 40 minutos de processamento mostrando ser dependente do tempo e umidade da massa de resíduos. Por meio dos resultados sugeriram a utilização de outro método de desinfecção concomitante.

Assim, Iannotti e Pisani Jr. (2013) permitiram o reconhecimento da técnica como pré-tratamento para RSS uma vez que associaram a desinfecção por micro-ondas com peróxido de hidrogênio e tiveram resultados mais próximos do esperado. A fração de inativação foi determinada em função do tempo de exposição e potência por unidade de massa, sendo a massa de RSS das amostras constante. Os resultados experimentais foram ajustados de acordo com modelos cinéticos. A fração experimental máxima de inativação foi de 95% obtida com irradiação de 178 W/kg durante 30 minutos.

Em Hossain *et al.* (2012), a influência do tempo de exposição (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) e temperatura (111°C, 121°C e 131°C) à pressão de vapor saturado automatizado foi investigada em regime permanente isotérmico, o que distancia dos processos de autoclavagem

em escala real, que operam em regime transiente não-isotérmico. Constataram que com o aumento do tempo e da temperatura o número de micro-organismos patógenos diminui, porém a autoclavagem de RSS não foi efetiva no sentido de atingir o Nível III de inativação microbiana. As condições ótimas experimentais para o grau de inativação das células vegetativas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis* eram de 121°C durante 15 minutos para as bactérias gram-negativas, e de 121°C a 131°C, durante 60 e 30 minutos para as gram-positivas. Foi observado nos resíduos tratados o crescimento de bactérias dois dias após o tratamento (o autor considera como “recrescimento”), o que tornou possível concluir que algumas das bactérias sobreviventes voltaram a se reproduzir mesmo após a exposição ao calor úmido, devido à possível presença de nutrientes. O “recrescimento” foi constatado em células vegetativas, sendo que seria mais favorecida a observação em endósporos. As bactérias foram escolhidas com base em detecções durante o atendimento ao paciente no hospital estudado.

As diferenças no grau de inativação entre bactérias gram-positivas e gram-negativas podem estar relacionadas às diferentes estruturas da parede celular das bactérias.

Macedo (2013) realizou um diagnóstico do gerenciamento dos RSS de um hemocentro e avaliou a eficácia da descontaminação de bolsas de sangue positivas para vírus causadores de hepatite e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). De início, foi avaliado o funcionamento da autoclave para o processo de descontaminação das bolsas de sangue descartadas, utilizando indicadores biológicos, químicos e físicos. Como indicadores biológicos, conforme previsto na Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, foram utilizados endósporos de *G. stearothermophilus*. Ampolas com esses endósporos em suspensão foram submetidas à autoclavagem sobre as bolsas de sangue. Em seguida, foram realizadas leituras de tiras de papel que quando colocadas dentro das ampolas, por mudança na coloração, indicam a presença ou não de endósporos. Após o teste piloto para a certificação do equipamento, constatou-se adequadas condições de monitoramento e funcionamento do equipamento. A tecnologia usada nessa avaliação não quantifica os micro-organismos, apenas indicam se existem ou não, com isso os dados se tornam imprecisos conforme o que rege a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004. As bolsas de sangue foram introduzidas em saco branco e autoclavadas. Observou-se as variações de temperatura e pressão durante um tempo de exposição de 30 minutos. A autoclave foi programada para funcionar em temperaturas de 127°C e pressão absoluta de 1,5 kgf/cm², conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (2010) como condição ideal para inativação de micro-organismos em bolsas de sangue, no

tratamento prévio preconizado em legislação. Termopares foram instalados na autoclave para aferição das temperaturas nas extremidades inferior, intermediária e superior dos sacos plásticos contendo as bolsas, sendo que para aferição nesses três pontos os termopares eram posicionados em uma das regiões em cada teste feito. Macedo (2013) concluiu que a variação da temperatura no interior da autoclave, constatada através de sensores térmicos, influenciou os resultados dos testes com autoclavagem de bolsas de sangue. Com isso, defendeu que a redução da quantidade de bolsas alojadas no interior da autoclave isto é, menor que 80%, poderá permitir melhor circulação de vapor e pressão no interior da autoclave. Embora o tratamento por autoclave tenha sido eficaz eliminando os vírus da Hepatite C e da AIDS, o material genético do vírus causador da Hepatite B não foi exterminado nas condições estudadas. Esses estudos foram aplicados e avaliados considerando o processo de tratamento intraestabelecimento (prévio à coleta externa, tratamento e disposição final).

Acredita-se que o tempo de exposição usado esteja fora do convencional utilizado para esse tipo de tratamento térmico, o que poderia ter sido um fator de grande influência na inativação dos micro-organismos estudados. As temperaturas de funcionamento da autoclave poderiam ter sido variadas para uma melhor análise do resultado.

Recentemente, Huesca-Espitia *et al.* (2016) analisaram durante o processo de autoclavagem o mecanismo de destruição de endósporos de *G. stearothermophilus*, fazendo observações quanto à atividade, estrutura proteica e mutagênese. Os endósporos submetidos à autoclave não sofreram mutações genéticas. Os resultados indicaram que os micro-organismos mortos em autoclave não podem ser revividos, tentaram três métodos de reativação do metabolismo dessas bactérias, porém o processo de autoclavagem provocou desnaturação das proteínas e danos à atividade das enzimas da região nuclear.

Uma vez comprovada a reprodução de células vegetativas dispersas em amostras de RSS típico, sendo a forma esporulada mais resistente ao estresse ambiental, a proposição do presente estudo consistiu em avaliar tecnicamente a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em RSS, sob as condições operacionais de tratamento de RSS extraestabelecimento semelhantes a equipamentos em escala real. A ausência de dados que comprovem a eficácia do processo de autoclavagem seguida da falta de condições pré-estabelecidas como tempo, temperatura e pressão de vapor, além da possibilidade de reprodução dos micro-organismos após tratamento foram os principais propósitos deste estudo.

3.5 Modelos cinéticos isotérmicos de inativação

A Cinética química, ou cinética de reação, analisa as diferentes condições experimentais e suas influências como velocidade, temperatura e outros mecanismos ou estados de transição, para a construção de modelos matemáticos que descrevam as características de uma reação química. Modelos matemáticos permitem uma simulação do desempenho dos equipamentos utilizados no tratamento de RSS.

Gardner e Shama (1998) descrevem os modelos utilizados nos casos de descontaminação por ultravioleta (UV). Afirmam que o modelo cinético de primeira ordem representa efetivamente um processo de inativação de micro-organismos pela relação fluência do UV e número de sobreviventes, ou seja, quando a inativação dos endósporos se dá por um único fator prejudicial. Tal inativação, conhecida como “único-alvo”, é descrita pela fórmula:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = e^{-k.F} \quad (1)$$

onde, k é o coeficiente de inativação, $F(\text{J}/\text{cm}^2)$ a fluência, produto da potência pelo tempo de irradiação por unidade de área de exposição, N é a concentração de micro-organismos em algum período de tempo e N_0 é a concentração de micro-organismos no tempo inicial.

Em seguida, Gardner e Shama (1998) explicam o modelo cinético ideal para processo que envolvem vários fatores prejudiciais, necessários para a inativação, o modelo cinético de “alvos-múltiplos”:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = 1 - (1 - e^{-k.F})^n \quad (2)$$

onde, k é o coeficiente de inativação, F a fluência, N é a concentração de micro-organismos em algum período de tempo e N_0 é a concentração no tempo inicial.

No estudo de Xiong *et al.* (1999), foram discutidos oito modelos cinéticos de desinfecção, destacando as diferenças entre as curvas de sobrevivência dos gráficos gerados: curvas lineares, curvas com um resalto, curvas bifásicas e curvas sigmoidais. Observaram que no modelo cinético de primeira ordem, a velocidade de uma reação química é proporcional ao produto das concentrações dos reagentes.

Lambert (2003) também estudou a aplicabilidade dos modelos de inativação térmica para os micro-organismos. Inclusive desenvolveu testes com *Geobacillus stearothermophilus*. Sob influência de temperatura constante, os dados de inativação térmica foram utilizados para avaliar a adequação da equação:

$$\log R = M \left[1 - \exp\left(-K_{0,T} t^h\right) \right] \quad (3)$$

em que, M é a redução de log máximos atingíveis, $K_{0,T}$ é a constante de velocidade de inativação observada a uma dada temperatura e h é o expoente Hom. T é dependente da temperatura e pode ser substituída pela Lei de Arrhenius.

Após extensa revisão bibliográfica, Lambert (2003), propôs a seguinte equação para casos de temperatura variável:

$$\log R = M[1 - \exp(-10^{[P_1 - (P_2/T) t [P_3 - (P_4/T)]]})] \quad (4)$$

onde P_1 , P_2 , P_3 e P_4 são derivadas experimentalmente dos parâmetros de Arrhenius.

Patazca *et al.* (2006) pesquisaram sobre a inativação cinética dos endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em processos com altas pressões e temperaturas elevadas. O objetivo do estudo foi examinar a resposta dessa bactéria às várias situações de temperatura, tempo e pressão, como 500 a 700 MPa, 92°C a 111°C e 0,01 a 360s. O efeito da temperatura e pressão sobre a inativação dos endósporos durante o tempo de exposição foi analisado através da cinética de primeira ordem, ou Lei de Chick:

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad (5)$$

Nos cálculos de tratamento térmico, a cinética de primeira ordem foi descrita por redução decimal dos valores de tempo e temperatura, chamado de D . O valor de D foi obtido a partir de $\log(N/N_0)$, em função do tempo e de k . A partir da curva de sobrevivência obtida na pressão constante, $D_{T,P}$, foi calculada a temperatura:

$$D_{T,P} = \frac{t}{\log\left(\frac{N}{N_0}\right)} \quad (6)$$

O valor da pressão na temperatura constante $D_{P,T}$ foi obtido a partir da curva de sobrevivência:

$$D_{P,T} = \frac{t}{\log\left(\frac{N}{N_0}\right)} \quad (7)$$

Consequentemente foram calculadas as resistências dos endósporos à temperatura e pressão (z_T e z_P):

$$z_T = -\frac{1}{["declive"]} = \frac{T_2 - T_1}{\log\left(\frac{D_{T_1,P}}{D_{T_2,P}}\right)} \quad (8)$$

$$z_P = -\frac{1}{["declive"]} = \frac{(P_2 - P_1)}{\log\left(\frac{D_{T,P_1}}{D_{T,P_2}}\right)} \quad (9)$$

O estudo forneceu dados cinéticos sobre os efeitos da pressão e temperatura sobre a inativação de endósporos resistentes ao calor, sob condições aplicáveis ao tratamento comercial de alimentos com baixa acidez. Patazca *et al.* (2006) concluíram que o aumento de temperatura devido à compressão adiabática foi parte do processo de alta pressão, sendo

utilizado para acelerar a inativação, que foi caracterizada por elevadas temperaturas sob condições isobáricas e isotérmicas. Através dos gráficos gerados foi possível avaliar a inativação cinética sob tratamento térmico tradicional e de alta pressão em combinação com o calor. O comportamento térmico dos endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* ao calor úmido convencional sugeriu a elevada resistência térmica do micro-organismo, que diminuía somente à medida que a pressão ou temperatura aumentavam.

Em Ministério da Saúde (2010) é relatado o teste de inativação microbiana em bolsas de sangue. Duas autoclaves diferentes foram equipadas com sistemas de monitoramento dos ciclos e registro de temperatura em tempo real. Para determinação numérica dos micro-organismos e validação do processo de autoclavagem, compararam o impacto do tratamento em relação ao vírus de Hepatite B (VHB) e em endósporos de *G. stearothermophilus*. Para avaliar o grau de inativação utilizaram a modelagem de Arrhenius. O ciclo de autoclavagem proposto na pesquisa foi eficaz para inativação de micro-organismos em bolsas de sangue, atingiram o Nível III, com tempo de processo encurtado mas sem redução da eficácia. Foi preciso apenas adotar uma distribuição espacial das bolsas, sem haver contato entre elas e nem obstáculos à transferência de calor.

Dalrymple *et al.* (2010) pesquisaram a aplicabilidade de modelos cinéticos em processos de desinfecção fotocatalíticas, dentre eles os modelo de Hom e da Lei de Potência. A equação cinética que representa Modelo de Hom é:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N \cdot t^{m-1} \cdot c^n \quad (10)$$

na qual, k é a constante cinética de inativação, c é a concentração de biocida, n a ordem de reação do consumo de biocida.

Seguindo, para as Leis de Potência adota-se que o decaimento da concentração de micro-organismo não é de primeira ordem, sendo assim representada por:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N^x \cdot c^n \quad (11)$$

Ambos os processos são aplicados em sistemas combinados para inativação microbiana, os quais unem mais de um fator de exposição para o alcance da eficiência na desinfecção. Em vista da complexidade dos processos, muitos modelos cinéticos têm sido detalhadamente estudados e aplicados a critério de análises comparativas, (IANNOTTI, 2010).

Head e CenKowski (2010) desenvolveram métodos de modelagem de inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* expostos a vapor superaquecido. Um dos descritos, o modelo de Weibull, considera a variação biológica dentro de uma população de

micro-organismos com respeito à inativação térmica. Como resultado, é um modelo estatístico da distribuição de inativação em diferentes tempos, de maneira cumulativa, através da equação:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = - \frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (12)$$

onde, N_0 é o número inicial de micro-organismos, N é o número de micro-organismos no tempo t , t é o tempo do processo ou tratamento, α é o tempo característico ou parâmetro de escala e β é o parâmetro de forma (não-dimensional).

Assim, o modelo de Weibull é recomendado para descrever e modelagem de inativação de endósporos de *G. stearothermophilus* a temperaturas mais elevadas, de 145 à 175°C.

O modelo de Kamau é um modelo logístico que pode descrever curvas não-lineares de sobrevivência, conforme:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log 2 - \log[1 + e^{kt}] \quad (13)$$

sendo, N_0 a concentração inicial de micro-organismos, N é o número de micro-organismos no tempo t , t é o tempo do processo ou tratamento, e é a base do logaritmo natural ($e \approx 2,71$), e:

$$k = 4[(d_N/d_t)_{\max}]/N_0 \quad (14)$$

A derivada $(d_N/d_t)_{\max}$ é a inclinação da curva de sobrevivência e $k/4$ é a taxa máxima de inativação. Com duas fases distintas, as curvas de sobrevivência podem ser analisadas, de acordo com o modelo de Kamau, em dois tempos exponenciais através da fórmula:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log\left[\frac{2n}{1+e^{k_1t}} + \frac{2(1-n)}{1+e^{k_2t}}\right] \quad (15)$$

na qual, n e $(1 - n)$ representam duas frações de micro-organismos que se diferem quanto à resistência ao calor, sendo k_1 e k_2 as taxas de morte para cada fração.

Para Head e CenKowski (2010) poderia haver uma melhoria no modelo de Weibull e os efeitos da velocidade fossem considerados. A qualidade dos resultados da aplicação de tal modelo se deu pelas curvas de sobrevivência obtidas para os endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* tratados.

Pisani Jr. *et al.* (2008), Tonuci *et al.* (2008) e Oliveira *et al.* (2010) realizaram testes de eficiência no tratamento de RSS por micro-ondas. Foram inoculados micro-organismos das espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e endósporos de *Bacillus atrophaeus* na forma vegetativa, para o processo de aquecimento dielétrico provocado por micro-ondas em escala de laboratório, reproduzindo a escala real. Foram analisadas a influência do tempo de

exposição à radiação e da potência por unidade de massa de resíduo no percentual de inativação dos micro-organismos para a umidade de entrada do resíduo de 50% em massa. Os resultados experimentais foram ajustados baseados na Lei de Chick, ou cinética de primeira ordem, permitindo concluir que a técnica de tratamento de RSS pode ser efetiva desde que as condições experimentais sejam bem estabelecidas.

A Lei de Chick foi considerada apropriada ao caso por se tratar de tratamento térmico. Segundo Chick (1908), o aumento de temperatura sobre a velocidade de desinfecção apontava para uma estreita analogia com muitas reações químicas. O processo de desinfecção é influenciado pela temperatura em uma forma ordenada, na qual a conhecida equação de Arrhenius pode ser aplicada.

Pesquisas comprovam a necessidade do uso de tal modelo cinético para esses processos. Rahn (1945 *apud* Cavalieri e Rosenberg, 1957, p. 23) propôs que o processo de inativação se assemelha a uma reação biomolecular de primeira ordem. Sua teoria do mecanismo de declínio exponencial assume a desnaturação da molécula de proteína como causa essencial da morte da célula.

Cavalieri e Rosenberg (1957) determinaram que estas ligações de hidrogênio no DNA podiam ser separadas por calor ou processos químicos mantendo um determinado número mínimo de ligações de hidrogênio, que quando excedido, resultaria em uma clivagem espontânea dos restantes das ligações de hidrogênio e desnaturação. Foram medidas as temperaturas dos RSS em autoclavagem em função do tempo e da massa, porém, não foram obtidas as frações de inativação ou os níveis de inativação.

DiDomenico (1993) não sabia se a ordem logarítmica de inativação era devido a uma reação molecular ou à desnaturação das proteínas. A taxa de bactérias em inativação era diretamente proporcional ao teor de umidade do meio, e, em geral, seguia uma cinética exponencial. Chick e Martin (1910) descreviam a desnaturação de proteínas como uma reação monomolecular com água em que as proteínas coagulavam ou precipitavam. Estudos posteriores concluíram que a estrutura espacial de proteínas e ácidos nucleicos eram mantidas por ligações de hidrogênio molecular.

Oliveira *et al.* (2010) também utilizaram a lei de Chick para determinar os níveis de inativação microbiana em relação às condições experimentais. Foram inoculados com micro-organismos da espécie *Bacillus atrophaeus* na forma de endósporos para o processamento com micro-ondas em escala de laboratório determinando a fração de inativação em função do tempo de exposição à radiação e potência por unidade de massa de resíduo.

Uma avaliação da influência do vácuo no aquecimento do resíduo por exposição ao calor úmido feita em Dengchao *et al.* (2011) permitiu concluir que o grau de vácuo tem uma influência sobre a penetração de calor e o efeito esterilizante no resíduo. Os RSS foram introduzidos em autoclave, sendo a porta fechada e selada. Uma bomba de vácuo foi utilizada para extrair o ar para fora da câmara. O vapor foi injetado na câmara para garantir que a pressão alcançaria o valor de configuração. O processo foi repetido várias vezes. Por fim, a temperatura foi mantida a mesma durante o tempo de esterilização, 120°C, a fim de assegurar a desinfecção. Graus de vácuo mais elevados fizeram com que a temperatura elevasse com a mesma pressão na câmara de esterilização, o que resultou na alta transferência de calor e melhor taxa de esterilização. Os fatores críticos que influenciaram a taxa de esterilização foram temperatura e tempo. O ar afetou tanto a natureza do gás quanto a transferência de calor para o centro da amostra. A pesquisa indica que o efeito do vácuo em associação com o tempo, temperatura e contato direto do vapor com a superfície do RSS podem influenciar positivamente na eficácia do tratamento de resíduos por autoclave.

Já Galvão *et al.* (2013) avaliaram a eficácia da descontaminação microbiológica a fim de comprovar a eficiência do tratamento térmico por autoclavagem dos resíduos sólidos infectantes descartáveis e dos resíduos infectantes reutilizáveis gerados no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais. No primeiro teste, os resíduos foram submetidos a tratamento por autoclave e a eficiência do processo foi verificada com o uso de indicadores biológicos para *Geobacillus stearothermophilus*. No segundo, os tubos de ensaio contendo os resultados do cultivo do micro-organismo *M. tuberculosis* foram acondicionados em caixas de aço inox (caixas metálicas), e um frasco do indicador biológico foi posicionado no fundo de cada caixa metálica. A análise da descontaminação dos resíduos infectantes acondicionados em sacos para autoclave demonstrou que não estavam sendo adequadamente tratados. Por outro lado, os resíduos exclusivos do laboratório de tuberculose foram devidamente tratados. O estudo verificou que a autoclavagem pode não ser efetiva, porém não foram disponibilizados dados que permitissem a obtenção de parâmetros cinéticos ou ajuste de modelo para simular o processo.

Contudo, para analisar os sistemas de tratamento de RSS através do conhecimento do nível de inativação microbiana o processo de desinfecção em batelada está associado ao modelo cinético de primeira ordem (Lei de Chick), segundo Geankopolis (2003), através da equação:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad (16)$$

Sendo que N é o número de micro-organismos, k é a constante cinética de primeira ordem (s^{-1}) e t é o tempo (s), integrando essa equação tem-se:

$$\int_{N_0}^N -\frac{dN}{N} = \int_0^t k \cdot dt \quad (17)$$

O número de micro-organismos no instante inicial é representado por N_0 . De acordo com o modelo cinético de primeira ordem é possível pressupor as hipóteses de população homogênea de micro-organismos, escoamento *plug-flow* ou batelada de mistura completa e temperatura uniforme ao longo do resíduo com distribuição homogênea da radiação. A constante cinética é dependente da energia de ativação e da temperatura, conforme a Lei de Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (18)$$

na qual k_0 é o fator pré-exponencial (s^{-1}), E_a é a energia de ativação (J/mol) e R é a constante universal dos gases ideais.

$$\ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = \int_0^t k_0 \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \cdot dt \quad (19)$$

Portanto, segue a fração de inativação de micro-organismos:

$$x(\%) = \frac{(N_0 - N)}{N_0} \cdot 100 \quad (20)$$

A variação da temperatura em função do tempo é obtida experimentalmente. O fator pré-exponencial (k_0) da Lei de Arrhenius é pouco dependente da temperatura e por isso, deve ser assumido como sendo constante no estudo (LEVENSPIEL, 1999). A energia de ativação (E_a) é um parâmetro dependente da intensidade da radiação. A integração numérica é feita pelo método de Simpson e a determinação de E_a e k_0 pelo critério de mínimos quadrados.

Hossain *et al.* (2012) usaram a equação $\ln(N_0/N)$ em função do tempo para determinar a inativação dos endósporos. Com isso, nas condições experimentais de esterilização a vácuo para a inativação de *Bacillus subtilis*, seus gráficos obtiveram retas e curvas decrescentes, o que comprova a não utilização da Lei de Chick acoplada a Lei de Arrhenius e caracteriza experimentos não-isotérmicos, pois se a temperatura fosse uma constante em função do tempo a reta seria crescente passante na origem.

3.6 Modelos cinéticos não-isotérmicos de inativação

Corradini *et al.* (2006) usaram *Clostridium perfringens* para determinar curvas de crescimento não-isotérmicas sob três regimes de refrigeração diferentes. Assim, ao variar a temperatura, isto é, $T = T(t)$, segue-se que $t = a [T(t)]$, $k(t) = k [T(t)]$ e $t_c(t) = t_c [T(t)]$.

A equação torna-se então:

$$\frac{dy(t)}{dt} = \frac{k[T(t)]a[T(t)]\exp[k[T(t)]\{t_c[T(t)] - t^*\}]}{[1 + \exp[k[T(t)]\{t_c[T(t)] - t^*\}]]^2} \quad (21)$$

onde t^* é definido como:

$$t^* = \frac{1}{k(T)} \log_e \left[\frac{\exp[k(T)t_c(T)]a(T) + y(T)\{1 + \exp[k(T)t_c(T)]\}}{a(T)\exp[k(T)t_c(T)] - y(T)\{1 + \exp[k(T)t_c(T)]\}} \right] \quad (22)$$

As curvas de crescimento começaram na origem, ou seja, no tempo $t = 0$, $N(0) = N_0$ e, portanto, $y(0) = \log(1) = 0$, possibilitando uma inversa analítica, na qual o tempo que corresponde a qualquer taxa de crescimento (isotérmico), t^* , foi expresso na fórmula.

Segundo Corradini e Peleg (2006), para descrever as curvas de sobrevivência côncavas, utilizaram a equação para modelos não-isotérmicos:

$$\frac{dy(t)}{dt} = \frac{k(T)a(T)\exp\{k(T)[t_c(T) - t^*]\}}{[1 + \exp\{k(T)[t_c(T) - t^*]\}]^2} \quad (23)$$

sabendo que $t^* = \text{Eq. (22)}$.

O crescimento microbiano seguido de inativação ou vice-versa, pode se tornar um problema de saúde pública e segurança. Os modelos matemáticos que descrevem tais transições podem servir como ferramenta para avaliar os riscos envolvidos ou até mesmo para reduzi-los. Isto pode ser feito através da geração de uma curva de crescimento ou inativação que revelaria se a sobrevivência dos micro-organismos ao final do tratamento estaria em um nível aceitável (Corradini e Peleg, 2006).

A utilização de modelos cinéticos pode permitir uma descrição adequada do comportamento obtido e a simulação do processo de desinfecção por autoclavagem. Revisando a literatura, percebe-se a escassez de pesquisas com aplicação de modelos cinéticos em autoclaves, que mostrem, tempo, temperatura e pressão associados à inativação microbiana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de síntese dos resíduos, quarteamento, distribuição granulométrica, análise de teor de umidade, esterilização e separação das amostras foram realizadas no Laboratório de Resíduos Sólidos e Laboratório de Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP). No Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) de Araraquara foram realizados os testes de inativação, fração de ocupação e reprodução de micro-organismos, mais especificamente com as bactérias *Geobacillus stearothermophilus*, bioindicadores do tratamento por calor úmido sem combustão, através da variação de temperatura, pressão, tempo de exposição e fração ocupada, visando à otimização do tratamento por autoclave.

O objeto de estudo foi a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em RSS (cepa adquirida da Coleção de Cultura Cefar Diagnóstica (CCCD) com concentração de 10^8 endósporos/mL (frasco de 10 mL), bioindicadores estabelecidos por regulamentações da Anvisa e Cetesb para avaliação de tratamento térmico sem combustão. Os endósporos foram inoculados nos RSS para avaliação da eficácia da autoclavagem perante condições variadas de tempo de contato, temperatura e pressão de vapor. Os RSS estudados para composição das amostras, que podem ser tratados por autoclave, são os pertencentes aos grupos A₁, A₂ e A₄, pois os pertencentes aos grupos A₃ e A₅ devem receber outras formas de tratamento ou destinação que são incineração, cremação ou sepultamento, grupo A₃, e incineração para o grupo A₅. Ressalta-se que os RSS do Grupo A₁ devem receber tratamento prévio nas unidades gerados antes de serem coletados, segundo a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004.

4.1 Equipamentos e acessórios

Para a realização da pesquisa foram utilizados os equipamentos:

- autoclave vertical da marca Phoenix, com capacidade de 75 litros, usada na esterilização dos resíduos após a síntese e quarteamento;
- balança de precisão Digimed, de pesagem máxima de 2 kg e mínima de 0,5 g, para quantificação dos resíduos;
- autoclave horizontal de bancada com capacidade de 14 litros, da marca Phoenix, conforme Anexo A, utilizada na realização dos testes de autoclavagem com as variações de

temperatura (116°C, 121°C, 125°C e 134°C), pressão absoluta (variando em 1,0 kgf/cm², 1,3 kgf/cm², 1,6 kgf/cm² e 2,3 kgf/cm²) e tempos de exposição de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos;

- cabina de segurança biológica Classe II tipo A1 com lâmpada germicida, do Grupo Veco, para a segurança no manuseio dos micro-organismos;

- estufa de cultura bacteriológica Fanem, modelo 002 CB, temperatura variável acima de 57°C, utilizada no cultivo das bactérias;

- Banho Maria digital mantido à temperaturas entre 45°C e 50°C para estocagem dos meios de cultura;

- 5 termopares do tipo T, que foram introduzidos em pontos diferentes na autoclave para aferir as temperaturas alcançadas no interior do equipamento, nas extremidades e interior da massa de RSS submetida a tratamento, sendo adequados para medição contínua desde - 270°C até 370°C (tendo em vista o formato cilíndrico da câmara, foram inseridos nos lados direito e esquerdo e os outros 3 na parte superior, em linha reta e espaçados um do outro, atingindo o centro da massa do material);

- indicador digital de temperatura com 8 canais de entrada para termopares e software para representação dos dados, marca FieldLogger 512k, que coletou as temperaturas obtidas durante todo o processo;

- computador com as configurações necessárias para o gerenciamento dos dados e criação dos gráficos através do software fornecido pelo indicador digital;

- micropipeta automática de 100 – 1000 µL, para medição e transferência rigorosa das suspensões de endósporos;

- seladora de embalagens plásticas.

Os acessórios e materiais de consumo utilizados foram:

- lona plástica de 3,00 m de comprimento por 2,00 m de largura para quarteamento da amostra de resíduos;

- baldes de 100 e 50 litros, com tampa, para armazenagem prévia dos resíduos no Laboratório de Resíduos Sólidos;

- sacos para autoclave com capacidade de 20 litros cada, onde foram colocados os resíduos sintetizados para esterilização;

- meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA, *Tryptone Soya Agar*) para cultivo e estudo das bactérias;

- membrana de nitrato celulose de 0,22 µm;

- sistemas de filtração à vácuo autoclavável;

- caldo Triptona de Soja (TSB, *Tryptone Soya Broth*) para lavagem da membrana;
- solução salina a 0,9%;
- placas de Petri;
- ponteiros descartáveis para micropipeta;
- béquer;
- vareta de vidro;
- espátula;
- gaze;
- pinça;
- seringas e agulhas;
- bandeja de vidro com capacidade de 3 L para auxílio na lavagem dos resíduos;
- forma de alumínio para autoclavagem dos resíduos;
- tubos cônicos para centrifugação tipo “Falcon”;
- frascos de tampa com rosca para esterilização do meio de cultura e da solução salina;
- equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas descartáveis e jaleco;
- lixeira com tampa acionada por pedal para armazenamento dos sacos plásticos brancos leitosos devidamente identificados como risco biológico (RSS do Grupo A).

4.2 Procedimentos experimentais

4.2.1 Determinando a caracterização dos resíduos

A primeira etapa constituiu em determinar a composição gravimétrica dos RSS, após ampla revisão bibliográfica de pesquisas desenvolvidas no Brasil, para síntese das amostras de resíduos. Para isso, usou-se a gravimetria encontrada por Oliveira *et al.* (2010), obtida através da caracterização dos RSS gerados por municípios da região de Ribeirão Preto (SP) destinados à unidade de tratamento por micro-ondas, conforme Tabela 3.4.

A síntese foi feita com resíduos classificados, de acordo com a NBR 10004/2004, como Classe II, não-perigosos, procurando-se alcançar características mais próximas do RSS gerado em estabelecimentos de saúde possíveis. Segundo STAATT (1998), um resíduo substituto pode ser preparado para ser usado no estudo e desenvolvimento de tecnologias para o tratamento dos RSS, representando através de sua composição gravimétrica (%) e massa específica aparente (kg/m^3), as características do resíduo proveniente dos serviços de saúde.

Materiais recicláveis foram coletados, como: papel, papelão, plástico duro, plástico filme, metais, espuma de polietileno (isopor) e vidro. Com o intuito de constituir um resíduo com características reais, foram utilizados tecidos, ossos de frango, e a carne seca para representar os outros materiais de difícil segregação, que em grande parte é a matéria orgânica. O papel foi representado por folhas de sulfite A4. O plástico filme e o duro foram cedidos por uma fábrica de embalagens de São Carlos (SP). Representando os metais, lacres de latas de alumínio. Foram utilizadas garrafas de vidro transparente. A borracha foi representada por luvas descartáveis, de látex, e bexigas de modelo canudo, e a madeira, por palitos de sorvete simbolizando a espátula descartável (garganta).

Após quantificação e distribuição em massa do total de resíduos, foram atingidos os índices da composição gravimétrica conforme os apresentados por Oliveira *et al.* (2010), Tabela 3.4 da página 47. Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Resíduos Sólidos.

Então, esses foram triturados para obtenção de menor volume em massa de resíduos, processo feito tanto em tratamento por autoclave quanto por micro-ondas que garante uma melhor desinfecção devido ao aumento da superfície de contato, e menor área de ocupação em aterro sanitário quando depositados. Com o intuito de se obter granulometria aproximada a encontrada por Oliveira *et al.* (2010), buscou-se alcançar uma variação no tamanho das partículas de 1 a 4 cm. Todos os materiais utilizados para compor o RSS foram triturados e cortados variando essas dimensões.

O papel foi encaminhado à gráfica do campus da USP de São Carlos e cortado em tiras, de diferentes larguras, de acordo com a Figura 4.2.

Figura 4.2 – Papel cortado em tiras utilizado para compor a massa total de resíduos

Fonte: autor

O plástico filme e duro foram cedidos por uma fábrica de embalagens de São Carlos, que já forneceu o material com as granulometrias desejadas. Segue a Figura 4.3 a) ilustrando

o plástico filme depois de triturado e b) com o plástico duro triturado, ambos utilizados para compor a massa de resíduos.

Figura 4.3 – a) Plástico filme triturado e b) plástico duro triturado

Fonte: autor

O papelão, o tecido, o isopor e as luvas descartáveis foram cortados à mão, em diferentes tamanhos. A Figura 4.4 ilustra a) o papelão e o tecido já sendo misturados ao total da massa de resíduos e b) o isopor cortado.

Figura 4.4 – a) Papelão e tecido sendo misturados na massa total após terem sido cortados e b) isopor cortado

Fonte: autor

Na Figura 4.5 têm-se o material utilizado para representar a borracha, ou seja, a) as luvas descartáveis cortadas à mão em diversos tamanhos e b) os balões de borracha (bexigas) que foram adicionadas para completar a massa, visto que sua granulometria favorecia o trabalho em questão.

Figura 4.5 – a) Luvas descartáveis cortadas e b) bexigas no formato canudo, ambos representando a massa de resíduos referente à borracha

Fonte: autor

Palitos de sorvete e lacres de latas de alumínio também foram acrescentados com o intuito de facilitar evitando o processo manual, visto que não era necessário o corte desse material. Segue a Figura 4.6.

Figura 4.6 – a) Palitos de sorvete representando a madeira e b) lacres de latas de alumínio representando o metal

Fonte: autor

A Figura 4.7 mostra o vidro após ter sido quebrado manualmente.

Figura 4.7 – Vidro após ter sido quebrado manualmente ainda não misturado na massa total de resíduos

Fonte: autor

A Figura 4.8 mostra a) os ossos b) e a carne seca utilizados, em tamanhos variados, para representar os outros materiais, compostos também por matéria orgânica.

Figura 4.8 – a) Os ossos de frango e b) a carne seca que compuseram o material

Fonte: autor

Ao retornarem triturados para o laboratório, foi realizado o quarteamento do total dos resíduos e amostragem para distribuição granulométrica, conforme NBR 10007/2004.

O procedimento consistiu em despejar todo esse resíduo em uma lona plástica de 3,00 m de comprimento por 2,00 m de largura, uma quantidade de 31,9 kg, e após mistura prévia para homogeneização do material foi iniciado o processo de quarteamento. A Figura 4.9 demonstra os resíduos depois de previamente misturados.

Figura 4.9 – Homogeneização dos resíduos antecedente ao quarteamento

Fonte: autor

O processo de divisão em quatro partes iguais da amostra pré-homogeneizada, foi repetido duas vezes, de modo que eram tomadas as duas partes opostas entre si para constituir uma nova amostra e descartadas as partes restantes. As partes não descartadas foram

misturadas totalmente e o processo de quarteamento foi repetido. A Figura 4.10 ilustra as quatro partes restantes para a segunda etapa do quarteamento.

Figura 4.10 – Resíduos sendo preparados para a segunda etapa do quarteamento

Fonte: autor

Do restante, as sobras foram novamente revolvidas e foi retirada e armazenada em recipiente de plástico com tampa a amostra de 302,45 g, conforme a Figura 4.11. O recipiente vazio pesou 165,22 g.

Figura 4.11 – Recipiente com amostra encaminhada para análise granulométrica

Fonte: autor

Essa alíquota foi encaminhada para análise de distribuição granulométrica, realizada no Laboratório de Mecânica dos solos, do Departamento de Geotecnia da EESC. A técnica,

conhecida como método de peneiramento, verifica os tamanhos dos grânulos dos resíduos e suas respectivas porcentagens em massa.

Foi feita a análise granulométrica, ou peneiramento, de 54,5 g de resíduos após realização do método de quartejamento e obtenção de uma amostra representativa, já que o total em massa de resíduos encaminhados ao Laboratório de Mecânica dos solos foi 302,5 g.

Para a extração dessa alíquota de 54,5 g foram necessários dois quartejamentos. Desses, obteve-se a amostra final novamente homogeneizada. A Figura 4.12 a) ilustra a primeira etapa do quartejamento, b) a segunda etapa do quartejamento e c) a amostra homogeneizada conduzida ao peneiramento.

Figura 4.12 – a) Primeira etapa do quartejamento, b) segunda etapa do quartejamento e c) amostra homogeneizada conduzida ao peneiramento

Fonte: autor

Uma quantidade de 18 peneiras com aberturas diferentes foram utilizadas para a análise granulométrica. O processo durou 20 minutos, sendo dividido em duas fases de 10 minutos cada. Na primeira, o material é passado por peneiras com aberturas maiores, depois, em peneiras com as aberturas menores. A Figura 4.13 mostra a técnica de peneiramento.

Figura 4.13 – Técnica de peneiramento

Fonte: autor

Após a análise, os resíduos retidos em cada uma das peneiras foram pesados para obtenção da porcentagem em massa retida em cada um das 18 peneiras.

Com o objetivo de comprovar a semelhança do resíduo sintetizado com o RSS submetido a tratamento, foram feitas comparações com outros estudos realizados em que se determinaram a granulometria. A Tabela 4.8 traz um comparativo da distribuição granulométrica fracionária de estudos com tratamento de RSS, a fração retida de acordo com o tamanho da abertura das peneiras foram bem próximas nos três trabalhos. As linhas coloridas, cada uma em uma tonalidade diferente, vêm realçar que as aberturas das peneiras foram semelhantes e seus resultados também.

Tabela 4.8 – Comparativo da distribuição granulométrica fracionária de estudos com tratamento de RSS

Oliveira <i>et al.</i> (2010)		Iannotti (2010)		Presente estudo	
Abertura (mm)	Fração da massa retida (%)	Abertura (mm)	Fração da massa retida (%)	Abertura (mm)	Fração da massa retida (%)
38,100	21,300	50,800	0,000	75,000	0,000
31,700	0,700	38,100	21,600	63,000	0,078
25,400	3,400	31,700	6,400	37,500	22,811
19,100	11,900	25,400	2,800	31,500	4,314
12,700	16,200	19,100	4,800	25,000	4,168
9,520	12,200	12,700	12,200	19,000	11,678
6,350	13,600	9,520	13,400	16,000	10,606
3,350	12,200	6,350	22,300	12,500	13,476
2,360	3,300	2,810	3,900	9,500	13,092
1,000	4,100	1,680	1,800	6,350	11,715
0,600	0,600	1,200	1,100	2,810	4,201
0,500	0,200	0,599	1,100	1,680	2,092
0,350	0,100	0,500	1,100	1,200	1,018
0,177	0,200	0,354	0,500	0,599	1,110
0,150	0,200	0,211	0,400	0,500	0,120
0,130	0,000	0,152	0,500	0,354	0,000
/	/	fundo	0,100	0,211	0,000
				0,152	0,000
				fundo	0,000

Fontes: Oliveira *et al.* (2010), Iannotti (2010) e autor.

Pequenas divergências podem ser notadas devido à variação do tipo do material caracterizado, também porque Oliveira *et al.* (2010) utilizaram RSS originado de estabelecimentos de saúde e já Iannotti (2010) e o presente estudo usaram resíduos não-perigosos, devido às alterações no tamanho das peneiras e à forma de trituração ou corte do material.

Em seguida, todo o resíduo foi transferido para os sacos e autoclavados por 60 minutos a 121°C e 2,0 kgf/cm², no Laboratório de Saneamento, com o objetivo de assegurar sua esterilidade. Para evitar a contaminação, após a esterilização, foram colocados nos sacos herméticos, conforme mostra a Figura 4.14 e transportados até a Unesp de Araraquara, para que fossem secos em estufa a 35°C por 24 horas.

Figura 4.14 – Saco hermético utilizado na armazenagem dos resíduos esterilizados

Fonte: autor

O teste de umidade foi realizado segundo APHA (2012). Duas amostras de resíduos foram coletadas e pesadas em 50 g. A primeira era composta de resíduo não-autoclavado, ou seja, àquele que servia como matéria-prima, o sintetizado para os testes (Amostra 1). Esse representava os RSS que chegam às unidades de tratamento. A outra era resíduo autoclavado, material tirado da autoclave após teste, representando os RSS que vão para aterro sanitário após tratamento (Amostra 2). Esses foram colocados em cápsulas de porcelana e submetidos à secagem em estufa à $\pm 105^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Houve um monitoramento até a estabilização na pesagem da amostra. Após isso, foram novamente pesadas e a diferença em relação ao início do teste indicada como teor de umidade.

Assim, a Amostra 1 apresentou um teor de umidade de 2,04% e a Amostra 2, teor de umidade de 4,76%.

Até então, os procedimentos seguiram com a preparação do resíduo a ser utilizado como amostra nas etapas experimentais. O Fluxograma 4.1 detalha as etapas de caracterização desse resíduo e os métodos de trabalho.

Fluxograma 4.1 – Etapas de caracterização do resíduo e métodos de trabalho

Fonte: autor

Nota: As imagens coloridas em vermelho são referente as características pertinentes aos resíduos sólidos e as em roxo sobre métodos de trabalho utilizados para alcance dessas propriedades.

A fase experimental da pesquisa, conforme seguem os itens 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6, e 4.2.7, foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de Araraquara (SP).

Os procedimentos microbiológicos foram realizados após uma adaptação metodológica frente aos estudos de Iannotti (2010) e à Norma Técnica da Cetesb P2.111/2007, em capela de fluxo laminar, ou cabina de biossegurança.

A suspensão de endósporos, em concentração de 10^8 endósporos/mL, foi mantida sob resfriamento entre 2°C e 8°C.

4.2.2 Preparação do material para os ensaios

Através da determinação da densidade específica aparente (massa de resíduo/volume da proveta), que foi de 26,90 g/L, foi verificada a massa específica aparente, de acordo com

Weil e Brady (2016), para determinação do volume de material que seria utilizado em cada ensaio. Na ocupação de 2/3 da autoclave (equipamento com capacidade total de 14 L) a massa específica aparente era de 250,99 g e na ocupação de 1/3 era de 125,53 g.

Dentro da autoclave, os resíduos eram colocados em bandejas de alumínio. Para que não houvesse estrapolação e consequente perda de material, resíduo e micro-organismos, determinou-se que o ideal seria a ocupação de 1/3 em todos os testes, ou seja, trabalhou-se sempre com aproximados 125,53 g. A Figura 4.15 ilustra a massa aparente de resíduos na bandeja de alumínio, referente à 1/3 de ocupação do volume total da autoclave. Também mostra a localização dos cinco termopares.

Figura 4.15 – Volume de 1/3 de ocupação da câmara da autoclave e posicionamento dos termopares

Fonte: autor

Determinado esse volume de resíduos para trabalho, as amostras eram preparadas. Para cada teste foram utilizadas duas amostras.

Para garantir a esterilidade dos resíduos, esses foram novamente autoclavados antes de cada teste, tendo em vista que a partir de alguns dias em saco fechado a umidade do material poderia favorecer o crescimento de fungos. Logo, as duas amostras já citadas eram armazenadas em sacos para autoclave, que cortados e lacrados por uma seladora de embalagens, eram novamente colocados em um saco de 20 L para autoclavagem. Após a esterilização a 121°C, o material já estava pronto para os ensaios, não sendo necessária secagem. A Figura 4.16 traz a imagem da amostra lacrada.

Figura 4.16 – Amostras dos resíduos em sacos lacrados pela seladora

Fonte: autor

Preparou-se a solução salina a 0,9% com água destilada na quantidade necessária para lavagem de cada amostra de resíduos e diluição dos endósporos. Essa solução era armazenada em frascos de vidro com tampa rosqueável e embalados e identificados com papel para preservação da esterilidade dentro do recipiente após a autoclavagem a 121°C, conforme ilustra a Figura 4.17.

Figura 4.17 – Frascos com tampa rosqueável contendo solução salina

Fonte: autor

O meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA, *Tryptone Soya Agar*) também era preparado com água destilada e armazenado em frascos com tampa rosqueável. Após serem embalados, os frascos eram autoclavados a 121°C e mantidos em Banho Maria à temperatura acima de 45°C. Utilizou-se 20 mL de Agar para cada em placa de Petri e contagem de UFC através da técnica de “pour plate”.

Do caldo de Triptona de Soja (TSB, *Tryptone Soya Broth*) utilizou-se 1 mL para lavagem de cada membrana e plaqueamento. O procedimento de preparo e esterilização era o mesmo do Agar, sendo depois mantido em temperatura ambiente até o uso.

Todo o material de consumo utilizado nos experimentos, tubos tipo “Falcon”, frascos com tampa rosqueável, pinças, gases, sistema de filtração, bandejas de vidro e de alumínio, eram embalados, identificados, esterilizados a 121°C e secos em estufa. A cabina de biossegurança era desinfetada com “Lysoform”, bactericida, germicida e fungicida com composição ativa de cloreto de benzil alquil dimetil amônio/cloreto de didecil dimetilamônio, e esterilizada pela luz UV, ligada um bom tempo antes de cada ensaio. Antes de ligar a luz UV, esse material preparado era colocado dentro da cabina para uma maior segurança da esterilização. As placas de Petri eram esterilizadas em forno de esterilização a $\pm 180^{\circ}\text{C}$ por três horas.

Foram instalados cinco termopares na autoclave para aferição da temperatura dentro de todo o espaço da câmara. Os termopares foram enumerados com etiquetas para posterior identificação. Segue a Figura 4.18 que mostra as devidas instalações.

Figura 4.18 – Autoclave, termopares, indicador de temperatura e computador devidamente instalados para os testes com autoclavagem

Fonte: autor

Os termopares 1, 2, 3, 4 e 5 foram conectados em um indicador de temperatura digital, que transferia todos os dados durante cada autoclavagem para o computador. Verificou-se o funcionamento desses equipamentos. O indicador foi configurado para

registrar a temperatura a cada minuto. Os dados coletados eram exportados como tabela para o Microsoft EXCEL, sendo assim elaborados os gráficos.

4.2.3 Fração volumétrica ocupada da câmara de autoclavagem

Para analisar a influência da fração volumétrica da massa de resíduos ocupada na autoclave foram feitos dois testes: o primeiro com 2/3 de ocupação, volume anteriormente definido de 250,99 g, e o segundo com 1/3, 125,53 g.

Apesar do conhecimento da capacidade de ocupação máxima permitida em equipamentos de esterilização/desinfecção a vapor, de 2/3, foi questionado se o processo poderia ser afetado por esse volume de preenchimento do equipamento, através principalmente de uma possível variação de temperatura. Por isso também o intuito de se instalar cinco termopares que atingiam pontos diferentes dentro da câmara.

Os testes foram feitos sob um tempo de contato de 10 min na temperatura máxima de 134°C. Foi feita a análise tanto do comportamento individual de cada termopar, como das aferições de todo o ciclo das duas autoclavagens.

4.2.4 Diluição, plaqueamento e inoculação dos endósporos

Para diluir a suspensão de *G. stearothermophilus*, visto que sua concentração era 10^8 e para os experimentos seria necessária a concentração de 10^6 endósporos/mL, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (24)$$

sendo:

C_1 a concentração inicial, 10^8 endósporos/mL;

C_2 a concentração a ser utilizada, 10^6 endósporos/mL;

V_2 o volume a ser utilizado, que foi sempre 1 mL de solução salina.

Assim, foi possível concluir que seriam necessários um volume (V_1) de 10 µL de suspensão a 10^8 diluídos em 990 µL de solução salina para inoculação nos testes experimentais.

Antes de cada inoculação foi feita a contagem em placa pela técnica de “pour plate” ou técnica de inoculação em profundidade para conferência do número de micro-organismos inoculados. Tal técnica consistiu na inoculação de volumes adequados da amostra em placas de Petri, com posterior adição de 20 mL do meio de cultura TSA, conforme Domingues *et al.*

(2007). Após 24 horas de incubação a 57°C, as bactérias viáveis presentes na amostra formaram colônias, de acordo com a Norma Técnica da Cetesb L5.201/2006. Calculado o número de endósporos por mL da suspensão, multiplicou-se o volume semeado (1 mL) pelo número de unidades formadoras de colônias contadas (UFC).

Eram separadas duas amostras de resíduos estéreis. Dentro da cabina de segurança inoculava-se 1 mL da suspensão diluída de 10^6 endósporos diretamente no resíduo de forma espalhada. Ainda dentro do saco de autoclavagem, agitava-se lentamente cada amostra.

4.2.5 Os testes de autoclavagem

Os testes com autoclavagem para a determinação da fração de inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* consistiram em realizar 18 ensaios com tratamento de RSS, em diferentes condições operacionais, para observar através de gráficos comparativos o resultado dessa fração de acordo com as variações de temperatura (116°C, 125°C e 134°C), pressão absoluta (variando em 1,0 kgf/cm², 1,6 kgf/cm² e 2,3 kgf/cm²) e tempos de exposição de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Foram inoculadas suspensões de endósporos diretamente no resíduo, sendo que após os ensaios, os micro-organismos foram recuperados do total da massa de RSS autoclavada.

O controle do funcionamento do equipamento era feito através do tempo de exposição na temperatura máxima pré-definida. A pressão absoluta variava de acordo com a temperatura: para 116°C era 1,0 kgf/cm², para 125°C a pressão foi de 1,6 kgf/cm² e na maior temperatura de trabalho, 134°C, foi 2,3 kgf/cm² a pressão absoluta. A autoclave permitia apenas a programação de exposição do tempo de contato na determinada temperatura máxima de trabalho.

Com isso, foram realizados primeiramente 18 ensaios para encontrar a situação ideal ou favorável à inativação dos endósporos. Sabendo-se que é padronizada em hospitais, laboratórios de análises clínicas, laboratórios de ensino e pesquisa, consultórios odontológicos e outros estabelecimentos a temperatura ideal para esterilização de materiais e tratamento prévio de RSS a temperatura de 121°C (pressão absoluta de 1,3 kgf/cm²), apesar de não terem sido encontrados trabalhos científicos que comprovem a eficiência da esterilização nessa circunstância, foram realizados dois testes para avaliar essa condição na inativação de *G. stearothermophilus*. Destaca-se, que segundo o Ministério da Saúde (2010), bolsas de sangue são esterilizadas a 121°C e tempo de exposição de 50 minutos. Em seguida, constatada a condição ideal realizou-se a triplicata do teste. Logo, para determinação da condição

otimizada para inativação dos endósporos foram realizados 22 ensaios. Segue a Tabela 4.9 com a organização dos testes.

Tabela 4.9 – Organização dos 22 primeiros testes para busca da condição otimizada à inativação microbiana

Teste	Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)	Pressão máxima atingida (kgf/m²)
1	116	0	1,0
2	116	10	1,0
3	116	20	1,0
4	116	30	1,0
5	116	40	1,0
6	116	50	1,0
7	125	0	1,6
8	125	10	1,6
9	125	20	1,6
10	125	30	1,6
11	125	40	1,6
12	125	50	1,6
13	134	0	2,3
14	134	10	2,3
15	134	20	2,3
16	134	30	2,3
17	134	40	2,3
18	134	50	2,3
19	121	50	1,3
20	121	60	1,3
21	-	-	-
22	-	-	-

Fonte: autor

Os testes de números 21 e 22 correspondiam à triplicata da situação na qual o resultado da fração de inativação seria a ideal.

4.2.6 A recuperação dos endósporos

Todo o procedimento de recuperação dos endósporos acontecia dentro da cabine de biossegurança.

Para cada um desses testes tinham-se dois ensaios, ou seja, inoculava-se 1 mL de 10^6 endósporos em duas amostras de resíduos. A primeira era chamada de teste controle, o qual a amostra não receberia o tratamento por autoclave. Contaminava o resíduo e em seguida já era feita a recuperação dos endósporos com o objetivo de se estimar possíveis perdas de micro-organismos durante os procedimentos. Na segunda amostra, o teste autoclavado,

contaminava-se o material a ser tratado para posteriormente realizar a recuperação, com o objetivo de analisar qualitativamente e quantitativamente a sobrevivência dos micro-organismos. A partir do teste controle obtinha-se o N_0 ; considera-se número de micro-organismos inoculados o recuperado de cada teste controle. A partir do teste autoclavado obtinha-se o N , número de micro-organismos sobreviventes ao tratamento.

Enquanto a segunda amostra estava sendo autoclavada era feita a recuperação dos endósporos da primeira.

Para a recuperação dos endósporos foi adicionado 1 L de solução salina a 0,9% estéril no resíduo dentro do saco para autoclave também estéril, seguido de leve agitação para enxágue do material. O saco era perfurado e todo o líquido coletado em frasco estéril. Na parte superior do funil de Büchner do sistema de filtração eram colocadas gazes abertas para retenção dos resíduos maiores, pois esses poderiam entupir a membrana do sistema se não fossem recolhidos. O funcionamento do sistema de filtração era acionado pela bomba de vácuo e os micro-organismos presentes no 1 L de solução eram retidos em membrana. A Figura 4.19 mostra o sistema de filtração utilizado nessa pesquisa.

Figura 4.19 – Sistema de filtração

Fonte: autor

Com o término desse procedimento, a membrana era retirada cuidadosamente com uma pinça estéril e colocada dentro de um tubo “Falcon”. Com 1 mL de TSB era feita a lavagem da membrana dentro do tubo e o líquido semeado em placa de Petri juntamente com 20 mL de TSA. Após 24 horas de incubação da placa a 57°C era feita a contagem das UFC pela técnica de “*pour plate*”. A Figura 4.20 mostra placas de Petri incubadas após testes.

Figura 4.20 - Placas de Petri incubadas após testes

Fonte: autor

A segunda amostra era retirada da autoclave e imediatamente colocada dentro da cabina. Todo esse processo acima descrito, conforme feito para o teste controle, era igualmente repetido: a lavagem do resíduo, a filtração, lavagem da membrana, técnica de “*pour plate*” para contagem e alcance do número de micro-organismos sobreviventes ao tratamento por autoclave (N).

Segue a Figura 4.21 com algumas etapas do procedimento de recuperação dos endósporos feita em cabina de biossegurança.

Figura 4.21 – a) Rompimento do saco com resíduos, b) recolhimento da solução, c) início da filtração, d) remoção da membrana, e) TSB sendo semeado em placa e f) finalização da técnica de “pour plate”

Fonte: autor

4.2.7 Testes com reprodução dos micro-organismos após tratamento

A última etapa constituiu da verificação da possível reprodução dos micro-organismos mesmo após o tratamento por autoclave. O método foi desenvolvido com o objetivo de comprovar se o resultado da inativação perante a condição otimizada realmente esterilizava o resíduo.

Foram realizados três testes em triplicatas. Eram três condições de tempo de exposição à temperatura ambiente: 24 horas, 48 horas e 5 dias. A partir de 5 dias a amostra estaria vulnerável a presença de fungos, devido à umidade do resíduo, e não seria possível a contagem de micro-organismos em placas contaminadas.

Todo o processo de inoculação e autoclavagem eram repetidos. Porém, a amostra do teste autoclavado foi armazenada em sacos para autoclave frouxamente lacrados e identificados. A Figura 4.22 ilustra a situação em que o material era conservado nos períodos acima citados.

Figura 4.22 – Avaliação da reprodução das bactérias após tratamento

Fonte: autor

Passado o tempo de exposição à temperatura ambiente para cada amostra, o método de recuperação de endósporos era replicado. Ressalta-se que o teste controle foi realizado para cada ensaio.

As placas resultantes desses testes eram incubadas e contadas as UFC após 24 horas.

Uma reprodução esquemática da proposta metodológica nas etapas experimentais de inoculação, recuperação, plaqueamento, obtenção da fração de inativação perante as condições de autoclavagem, frente aos objetivos da pesquisa, segue representada no Fluxograma 4.2.

Fluxograma 4.2 – Representação da proposta metodológica dos testes com inativação microbiana frente aos objetivos da pesquisa

Fonte: autor

Nota: As imagens coloridas em azul referem-se aos objetos de estudo, em verde, tratam-se de procedimentos experimentais e as imagens em laranja estão relacionadas ao objetivo da pesquisa.

4.2.8 Determinando a fração de inativação e proposta de aplicação do modelo cinético

As frações de inativação foram determinadas através da relação de N_0 e N , ou seja, a recuperação da inoculação e dos testes, utilizando a equação 20 descrita no item 3.5. Os resultados referentes às frações de inativação encontradas em cada situação foram apresentados em tabela.

A pesquisa foi conduzida de modo a permitir que aplicações de modelos cinéticos transientes não-isotérmicos fossem possíveis em trabalhos futuros. Realizou-se uma apresentação e discussão de estudos com modelos cinéticos isotérmicos e não isotérmicos de inativação na revisão bibliográfica, tendo em vista que resultados dessa proposta podem descrever matematicamente todo o processo de autoclavagem e a inativação dos endósporos de *Geobacillus stearothermophilus*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes realizados com autoclavagem de RSS contaminado com endósporos de *G stearothermophilus* perante as condições variadas de tempo, pressão de vapor e temperatura, a influência da fração volumétrica de ocupação dos resíduos dentro da câmara da autoclave, as frações de inativação microbiana, o estudo sobre reprodução dos endósporos, mesmo após tratamento, além da proposta metodológica elaborada para avaliação de tratamento de RSS frente às dificuldades encontradas para desenvolvimento dessa pesquisa, são resultados apresentados a seguir.

5.1 A caracterização dos RSS e suas influências na avaliação do tratamento

São etapas da caracterização dos resíduos sólidos: composição gravimétrica, distribuição granulométrica, densidade específica aparente, massa específica aparente e teor de umidade. Para a composição gravimétrica foram classificados aproximadamente 32 kg de resíduos, porém, não foi necessária a utilização de toda essa quantidade de resíduos nesse trabalho. Foi possível atingir parâmetros bem próximos das características dos RSS gerados nos estabelecimentos de saúde humana e animal.

Esses resíduos foram embalados, esterilizados e secos em temperatura média de 35°C. Porém, já nos primeiros testes piloto foi possível observar, após plaqueamento e incubação, o crescimento de fungos. Isso porque a utilização do material nos testes não tinha uma frequência alta e os sacos com resíduo estéril e umidade de 2% ficavam armazenados por dias. Contudo, optou-se por autoclavar uma quantidade de amostras necessárias para a realização de dois dias de testes, sendo que a incidência de placas contaminadas por fungos se tornou praticamente nula nos outros testes realizados. Ressalta-se que essas amostras lacradas não iam para secagem em estufa sendo conservadas na umidade de aproximadamente 5%.

Foi feito um ensaio com centrifugação para encontrar a melhor condição de umidade do resíduo para trabalho, seco ou úmido. Duas amostras foram esterilizadas. A primeira foi para secagem em estufa e a segunda não. Passadas as 24 horas a 35°C, inoculou-se 10^6 endósporos nas duas amostras. Em seguida fez-se a lavagem com 1 L de solução salina estéril a 0,9% que foram distribuídos em 16 tubos para centrifugação do tipo “Falcon” (1 L para cada saco de resíduo, sendo 32 tubos no total). A Figura 5.23 mostra parte dos tubos dentro da centrífuga.

Figura 5.23 – Centrifugação das amostras de resíduos com 2% e 5% de umidade

Fonte: autor

A centrifugação foi feita a 6000 rpm durante 20 min. Após esse procedimento, os tubos foram expostos a um agitador do tipo “Vortex”, e passados 15 min, 1 mL do material sedimentado foi plaqueado com 20 mL de TSA (“*pour plate*”), sendo que para cada tubo tinha-se uma placa. Feita a contagem de UFC nas placas, observou-se que a umidade ideal do resíduo para trabalho era de aproximadamente 5%, pois nessas obteve-se um maior índice de recuperação de micro-organismos. Isso significou que como a capacidade de absorção de um material seco é maior, têm-se consequentemente uma maior retenção de micro-organismos dissolvidos nesse líquido absorvido seguido de um menor índice de recuperação (maior perda de endósporos). Na amostra de resíduo com umidade a 2% recuperou-se $1,4 \cdot 10^5$ endósporos de *G. stearothermophilus* e na umidade a 5%, $2,2 \cdot 10^5$.

5.2 Etapas do procedimento de autoclavagem e monitoramento das temperaturas

Com o objetivo de analisar o funcionamento da autoclave, suas regulagens, e se ocorreria variação na medição de temperatura entre os termopares, iniciou-se testes de situação controle, nos quais foram realizados ciclos completos de autoclavagem com o equipamento vazio. Primeiramente, a autoclave foi programada para ciclo “pacotes”, sendo que esse ciclo completo durou 1 hora e a temperatura máxima atingida foi de 134°C. A Tabela 5.10 apresenta todas as fases do ciclo completo “pacotes” e suas respectivas temperaturas, tempos de exposição e pressões absolutas.

Tabela 5.10 – Fases do ciclo completo para “pacotes” e suas respectivas temperaturas, tempos de exposição e pressões absolutas

Ciclo completo	Etapa do procedimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão absoluta (kgf/cm ²)
Fase 1	Aquecimento 1	93	10	-
Fase 2	Purga 1	-	1	-
Fase 3	Aquecimento 2	116	5	variável
Fase 4	Purga 2	-	1	-
Fase 5	Aquecimento 3	134	5	até 2,5
Fase 6	Esterilização	134	12	2,5
Fase 7	Despressurização	variável	2	variável
Fase 8	Resfriamento	variável	1	-
Fase 9	Secagem	variável	20	-

Fonte: autor

Na primeira fase do processo de autoclavagem, o aquecimento do equipamento foi dado de forma parcial, por 20 minutos. Nas duas etapas de purga, todo o ar do equipamento era eliminado. A secagem, última fase do ciclo completo, foi feita com a porta entreaberta.

Após a autoclavagem, os dados de temperaturas foram coletados do indicador. Gerou-se a tabela e o gráfico foi elaborado. O Gráfico 5.1 ilustra o primeiro teste de situação controle.

Gráfico 5.1 – Primeiro teste de situação controle

Fonte: autor

Observou-se que a temperatura variou de forma não significativa entre os cinco termopares, sendo que às 10 horas e 31 minutos o termopar 5 atingiu a temperatura de 134,6°C. A variação entre os medidores foi maior após a fase de esterilização, durante a despressurização.

Em seguida, a autoclave foi programada para ciclo “teste biológico”. Esse foi selecionado por ter um tempo de exposição e alcance de temperatura menores. O ciclo completo durou 45 minutos e a temperatura máxima atingida foi 121°C. A Tabela 5.11 apresenta todas as fases do ciclo completo “teste biológico” e suas respectivas temperaturas, tempos de exposição e pressões absolutas.

Tabela 5.11 – Fases do ciclo completo para “teste biológico” e suas respectivas temperaturas, tempos de exposição e pressões absolutas

Ciclo completo	Etapas do procedimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão absoluta (kgf/cm²)
Fase 1	Aquecimento 1	93	10	-
Fase 2	Purga 1	-	1	-
Fase 3	Aquecimento 2	116	5	variável
Fase 4	Purga 2	-	1	-
Fase 5	Aquecimento 3	121	5	até 1,5
Fase 6	Esterilização	121	10	1,5
Fase 7	Despressurização	variável	3	variável
Fase 8	Secagem	variável	10	-

Fonte: autor

Na primeira fase do processo de autoclavagem, o aquecimento do equipamento era dado de forma parcial, por 20 minutos. Nas duas etapas de purga, todo o ar do equipamento era eliminado. A secagem, última fase do ciclo completo, era feita com a porta entreaberta.

Após o término do ciclo, os dados de temperaturas foram coletados do indicador. Gerou-se a tabela e o gráfico foi elaborado. O Gráfico 5.2 ilustra o segundo teste de situação controle.

Gráfico 5.2 – Segundo teste de situação controle

Fonte: autor

Observou-se que a temperatura nesse caso também não sofreu variações significativas entre os cinco termopares, mas às 10 horas e 13 minutos o termopar 5 atingiu a temperatura de 122,3°C. A variação entre os medidores ocorreu durante a fase de secagem, talvez devido ao fato do equipamento estar com a porta entreaberta.

Nas duas situações foi possível observar uma variação na primeira fase do aquecimento, até atingir a faixa de 80°C, mas essa não foi significativa em nenhum dos casos.

5.2.1 Observações quanto à preparação do material

Foi descrito que se optou por trabalhar com uma fração de 1/3 de ocupação da autoclave nos testes, pois foram feitos ensaios piloto que indicaram ser essa a melhor condição. No início, a autoclavagem seria feita com 2/3 de ocupação da câmara sendo o resíduo conservado dentro do saco para autoclave. Ou seja, a amostra estéril seria mantida dentro do próprio saco que foi esterilizada, que se inoculou os endósporos, se fez o teste e a lavagem para recuperação dos micro-organismos. O procedimento contribuiria para a não contaminação da amostra e perda de micro-organismos inoculados. Porém, quando se autoclavava em temperaturas acima de 121°C o saco, fabricado para esse fim, entrava em ponto de fusão, popularmente falando, derretia. Coutinho *et al.* (2003), em uma discussão sobre as principais propriedades do polietileno de alta densidade (PEAD), informaram que o ponto de fusão do PEAD está entre 125°C e 132°C podendo sofrer pequenas variações de acordo com o teor de ramificações das cadeias. Candian e Dias (2009) estudaram o

comportamento do PEAD reciclado que apresentou um ponto de fusão acima de 122°C e até aproximadamente 135°C.

Assim, optou-se por colocar os resíduos em bandejas de alumínio, porém para que não houvesse estrapolação e consequente perda de resíduo e micro-organismos, feitas pesagens e simulações, determinou-se que o ideal seria a ocupação de 1/3 do volume da câmara da autoclave (14 L), correspondente a 125,53 g de massa específica aparente.

Para evitar a diminuição de endósporos no processo de recuperação, as bandejas de alumínio também eram lavadas com solução salina.

Para esses mesmos ensaios pilotos foram utilizadas amostras de resíduos esterilizadas a 121°C e secas em estufa por 24 horas a 35°C. Porém, feito o plaqueamento do recuperado dessas amostras foi possível observar em todas as placas o crescimento de fungos. A Figura 5.24 mostra a presença de colônia de fungos na placa.

Figura 5.24 – Identificação da presença de colônia de fungos na placa do ensaio piloto

Fonte: autor

Com isso, optou-se por ir esterilizando as amostras de acordo com a utilização. Os sacos com material estéril ficavam estocados por no máximo dois dias. Não era feita a secagem, considerando o resultado do teste de centrifugação, que secar poderia colocar em risco a esterilidade e que a secagem levava um dia para acontecer, gasto de tempo desnecessário (para secagem é necessária a entrada de ar dentro do saco, que pode trazer contaminantes).

Nos primeiros ensaios piloto tentou-se fazer a recuperação de endósporos conforme Oliveira *et al.* (2010) e Iannotti e Pisani Jr. (2013), porém devido ao difícil manuseio de todos os materiais e mais 4 L de solução salina no pequeno espaço da cabina de biossegurança a

contaminação de material e perdas de placas ocorreram em todos os casos. Tentou-se fazer o experimento em bancada, utilizando o bico de Bünsen, mas a recuperação levava certo tempo e seria inviável pelo risco de contaminação. Segue a Figura 5.25 identificada como contaminada por outras colônias. A identificação do crescimento de outros micro-organismos sempre foi feita através da morfologia colonial.

Figura 5.25 – Placa contaminada por outras colônias

Fonte: autor

Quando os testes com filtração começaram, a lavagem dos resíduos para recuperação de *G. stearothermophilus* feita por leve agitação do saco ocasionava um líquido cheio de pedacinhos de papel se dissolvendo, o que acabava por entupir a membrana e a sucção à vácuo era interrompida. Por isso, adotou-se a ideia de colocar uma gaze aberta na parte superior do funil de Büchner do sistema de filtração para reter esses resíduos maiores. A Figura 5.26 ilustra a membrana com os poros entupidos por resíduos dissolvidos.

Figura 5.26 – Membrana inutilizada por entupimento dos poros

Fonte: autor

5.3 Estudo da influência da fração volumétrica ocupada na câmara de autoclavagem

Esperava-se que a fração ocupada dos resíduos na autoclave poderia ser um fator de influência no tratamento, pois a porosidade do leito fixo formado pelas partículas do resíduo no interior do equipamento deveria interferir na penetração de vapor nos interstícios e consequentemente no aumento de temperatura da amostra. Acreditava-se que se houvesse variação de temperatura poderia ter região que não alcançasse a inativação desejada.

Contudo, foram feitos testes com 1/3 e com 2/3 de ocupação para observação de ocorrências na variação de temperatura entre os cinco termopares com relação ao preenchimento do espaço da câmara. Com 3/3 não foi feito por não ser permitida a ocupação total do equipamento. O resíduo utilizado nos testes não foi contaminado. Ambas as amostras foram submetidas a 134°C por 10 min.

Contatou-se que pequenas variações ocorrem quando comparando um termopar com outro, às vezes de até 3°C, mais essas não foram influenciadas nem pela presença ou ausência de resíduo dentro do equipamento (também foram feitos testes com o equipamento vazio). A fração de ocupação não foi um fator delimitante para a inativação de endósporos, pois a temperatura se manteve a mesma independentemente da quantidade de resíduo submetido à autoclavagem.

O Gráfico 5.3 mostra as aferições de temperatura nos cinco termopares durante o tempo de 40 min e na ocupação da câmara de 1/3.

Gráfico 5.3 – Indicadores de temperatura na ocupação de 1/3 da autoclave

Fonte: autor

O Gráfico 5.4 trata das aferições de temperatura nos cinco termopares durante o tempo de 40 min e na ocupação da câmara de 2/3.

Gráfico 5.4 – Indicadores de temperatura na ocupação de 2/3 da autoclave

Fonte: autor

Como dito anteriormente, em ambos os casos, o funcionamento da autoclave foi regulado para que o tempo de esterilização fosse de 10 minutos na temperatura de 134°C. Nesse período é possível observar que não há variação de temperatura entre os termopares e que independente da fração volumétrica de ocupação, a temperatura foi constante nessa etapa e se manteve na faixa de $\pm 134^{\circ}\text{C}$. A semelhança de toda a curva de aquecimento também vem comprovar que o tratamento de RSS por autoclavagem não sofreria influência na fração de inativação de micro-organismos quando variados os volumes de resíduos dentro do equipamento.

5.4 O comportamento da temperatura em função do tempo de exposição durante os processos de autoclavagem

As análises foram realizadas variando as temperaturas (consequentemente a pressão absoluta) e tempos de exposição. Obteve-se um gráfico para cada condição, sendo que os resultados foram compilados em quatro gráficos, cada um para uma temperatura: 116°C, 121°C, 125°C e 134°C. Os ensaios com 116°C, 125°C e 134°C, intervalados por 9°C, foram observados em seis tempos de exposição diferentes.

Na temperatura de 116°C a pressão absoluta foi de 1,0 kgf/cm², em 121°C foi 1,3 kgf/cm², a 125°C atingiu 1,6 kgf/cm² e 134°C a pressão absoluta foi de 2,3 kgf/cm².

O Gráfico 5.5 aponta as temperaturas em função do tempo considerando a variação do tempo de exposição nos seis testes realizados a 116°C.

Gráfico 5.5 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 116°C nos seis testes realizados

Fonte: autor

Cada linha representou um tempo de exposição diferente. Foi possível notar que o comportamento dessa relação temperatura por tempo foi o mesmo nas seis análises, com um rápido aumento da temperatura que fica constante ao atingir o máximo desejado, e passado o tempo de contato programado, a queda.

O Gráfico 5.6 apresenta os dois testes feitos sob a temperatura de 121°C e tempos de exposição de 50 e 60 min.

Gráfico 5.6 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 121°C nos dois testes realizados

Fonte: autor

Ocorreu uma redução da temperatura aos 116°C que é quando o equipamento libera o oxigênio para atingir a pressão esperada. Essa diminuição foi de aproximadamente 5°C. Nas duas condições de exposição, 50 e 60 min, as curvas tiveram o mesmo desempenho.

O Gráfico 5.7 mostra as temperaturas em função do tempo considerando a variação do tempo de exposição nas seis condições executadas a 125°C.

Gráfico 5.7 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 125°C nos seis testes realizados

Fonte: autor

As linhas representaram tempos de exposição diferentes, de 0 a 50 min em uma escala de 10 em 10. O desempenho dessa relação temperatura por tempo foi o mesmo nas seis análises, variando um pouco apenas no período de aquecimento do equipamento, porém, após

aproximadamente 25 min ficou constante ao atingir o máximo desejado, e decorrido o tempo de contato programado, a queda.

O Gráfico 5.8 aponta as temperaturas em função do tempo considerando a variação do tempo de exposição nas seis análises realizadas a 134°C, que foi a temperatura máxima de trabalho.

Gráfico 5.8 – Variação do tempo de exposição na temperatura de 134°C nos seis testes realizados

Fonte: autor

Da mesma forma que nos casos anteriores as curvas tiveram comportamentos parecidos, uma queda da temperatura aos 116°C devido à purga e permaneceram constantes quando atingido os 134°C.

Nota-se que o controle do equipamento foi feito por tempo de exposição na temperatura máxima desejada. Com isso, o período de permanência do resíduo dentro da autoclave variava não somente influenciado por esse tempo de contato, mas também pelo aquecimento, que apresentava um período maior quanto maior a temperatura desejada. Tais pontos podem ser observados na Tabela 5.12 que traz todas as condições estudadas frente ao tempo total da autoclavagem.

Tabela 5.12 – Condições de exposição e tempo total da autoclavagem de cada teste

Condições de exposição	Testes	Tempo total da autoclavagem
116°C - 0 min	11	26 min
116°C - 10 min	12	34 min
116°C - 20 min	13	49 min
116°C - 30 min	14	56 min
116°C - 40 min	15	64 min
116°C - 50 min	16	74 min
121°C - 50 min	19	77 min
121°C - 60 min	20	86 min
125°C - 0 min	9	29 min
125°C - 10 min	6	39 min
125°C - 20 min	7	47 min
125°C - 30 min	8	59 min
125°C - 40 min	10	67 min
125°C - 50 min	17	77 min
134°C - 0 min	5	29 min
134°C - 10 min	4	42 min
134°C - 20 min	3	50 min
134°C - 30 min	1	60 min
134°C - 40 min	2	69 min
134°C - 50 min	18	81 min

Fonte: autor

Conforme mencionado, para cada uma dessas 20 situações têm-se um gráfico representado no Apêndice A.

O aumento do tempo de autoclavagem devido ao aumento da temperatura foi verificado, por exemplo, se consideramos o tempo de contato de 50 minutos para cada uma das temperaturas: a 116°C o tempo de tratamento foi de 74 min, a 121°C e 125°C foi 77 min e a 134°C, 81 min.

Após a despressurização no painel digital do equipamento indicava que a porta ficasse entreaberta para resfriamento do material; entretanto, não se esperava a diminuição de temperatura para evitar riscos de contaminação da amostra em contato com o ar e consequente erro na contagem.

5.5 Inoculação, recuperação e plaqueamento

Logo nos primeiros ensaios piloto notou-se a necessidade de uma adaptação metodológica frente aos estudos de Iannotti (2010) e a Norma Técnica da Cetesb

P2.111/2007. Os objetivos eram que por meio da metodologia desenvolvida se recuperasse o maior número de endósporos possíveis; quanto menor a perda de micro-organismos maior a credibilidade dos resultados, principalmente no que diz respeito aos dados quantitativos, que se evitasse ao máximo a contaminação de placas por outras colônias e que os resultados fossem confiáveis de modo a permitir o desenvolvimento de trabalhos futuros, sabendo-se que encontrar as condições ideais para inativação dos endósporos de *G. stearothermophilus* pode significar um grande avanço nos processos de tratamento por autoclave nas próprias unidades de tratamento.

No início a proposta era recuperar um número entre 10^5 e 10^6 endósporos a partir da lavagem dos resíduos com 4 L de solução salina estéril, conforme Iannotti (2010). Porém, quando utilizado esse parâmetro a recuperação foi na ordem de 10^3 e 10^4 . Acreditou-se que a dificuldade se deu porque Iannotti (2010) trabalhou com massas de 405 g, 540 g e 810 g, enquanto nessa pesquisa utilizou-se 125 g. As bactérias podem ter sido muito diluídas o que não possibilitou recuperá-las em 3 mL (3 alíquotas de 1 mL). O método em pesquisas realizadas consistiu em misturar a amostra de solução ao resíduo e às bactérias, até garantir sua homogeneização, para então recolher as alíquotas com uma quantidade representativa de micro-organismos. Mas como garantir a homogeneização de uma mistura microscópica?

Outro aspecto que exigiu adaptação metodológica foi quanto à colocação dos resíduos dentro da autoclave. Como dito anteriormente, os sacos para autoclave entravam em ponto de fusão quando submetidos a altas temperaturas e por isso as amostras foram colocadas dentro de bandejas de alumínio. Porém, a lavagem dos RSS para recuperação dos endósporos não era possível dentro do mesmo recipiente, sendo então que, após a autoclavagem, a amostra era passada para um saco estéril e o recipiente também lavado com solução salina. Esse manuseio exigia muito cuidado para que não houvesse contaminação. Iannotti (2010) misturava os 4 L de solução salina dentro do mesmo recipiente que era conduzido ao tratamento com a amostra. A capacidade interna do micro-ondas utilizado nesse estudo era maior que a autoclave, 45 L. Certamente que o risco de perda de micro-organismos ou contaminação por outras colônias era menor.

Ou seja, desde o principio dos ensaios já foi possível concluir que lavar a amostra com 4 L seria inviável, ainda que o espaço para experimentação dentro da cabina de biossegurança ficaria muito comprometido e a longa duração de cada ensaio não permitia que os testes fossem em bancada com o uso do bico de Bünsen.

Além do teste de centrifugação descrito no item 5.1 ter possibilitado o resultado que a umidade influencia na recuperação de endósporos, também permitiu concluir que 1 L de

solução salina seria o suficiente para a lavagem do material desde que se concentrassem as bactérias.

Contudo, realizaram-se os primeiros testes piloto com filtração. A Figura 5.27 ilustra o teste com sistema de filtração para recuperação dos endósporos.

Figura 5.27 – Teste piloto com sistema de filtração

Fonte: autor

Feitos esses testes de filtração com 1 L de solução e concentração dos endósporos em membrana que era lavada com TSB para técnica de “*pour plate*”, recuperou-se em todos a ordem de 10^5 micro-organismos e não houve contaminação de placas. Vale ressaltar que para o desenvolvimento dos testes com microbiologia foi necessária a estruturação de uma técnica que avaliasse confiavelmente e que garantisse a eficácia dos processos de avaliação de inativação de micro-organismos por autoclavagem. Visto o resultado positivo e a eficiência e segurança desses, deu-se início aos ensaios programados com a aquisição de um sistema de filtração acrílico autoclavável, mais eficiente na sucção à vácuo.

A inoculação foi feita na ordem de 10^6 e em todos os experimentos quando realizada a diluição, plaqueava-se por “*pour plate*” para verificação se a inoculação estava dentro do esperado, pois a suspensão adquirida tinha concentração de 10^8 . A diluição foi feita conforme a equação 24 descrita no item 4.2.4. A Figura 5.28 mostra uma placa de validação de diluição com colônias de *G. stearothermophilus*.

Figura 5.28 – Placa com colônias de *G. stearothermophilus*

Fonte: autor

Além das placas de validação da diluição, para cada teste tinha-se duas placas: a referente ao N_0 , da qual se obtinha o número de micro-organismos recuperados considerados como inoculados, e a referente ao N , que representava o número de endósporos sobreviventes ao tratamento. Segue a Figura 5.29 exemplifica as placas identificadas pertencentes ao teste 18.

Figura 5.29 – Placas de Petri referentes ao teste 18

Fonte: autor

A placa identificada como “pour plate” correspondia a que validava a diluição, a identificada como “controle” foi a do teste controle, que avaliava a recuperação de endósporos (N_0), e a “autoclavado” era a resultante da recuperação após processo de autoclavagem.

5.5.1 Resultados e avaliação das frações de inativação

Dados que comprovassem a eficácia do processo de tratamento por calor úmido e a falta de condições pré-estabelecidas como tempo, temperatura e pressão absoluta, não tinham sido até então discutidos em outras pesquisas.

A partir dos 20 testes realizados constatou-se que a inativação dos endósporos atingiu 100% no tempo de 30 minutos de exposição à temperatura máxima de 134°C e pressão absoluta de 2,3 kgf/cm².

Sob cada condição de exposição, em função do tempo e da temperatura atingida dentro da câmara da autoclave, determinaram-se as frações de inativação microbiana conforme a equação 20, item 3.5. A Tabela 5.13 descreve as condições, a relação do número de micro-organismos inoculados perante os sobreviventes, resultando na fração de inativação.

Tabela 5.13 – Fração de inativação alcançada para cada condição estabelecida

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)	Pressão máxima atingida (kgf/cm²)	N_{inoculados} (N₀)	N_{final} (N)	Fração de inativação (%)
116	0	1,0	3,91 x 10 ⁵	1,79 x 10 ⁵	25,58
116	10	1,0	5,88 x 10 ⁵	2,54 x 10 ⁵	56,80
116	20	1,0	7,11 x 10 ⁵	2,24 x 10 ⁵	68,50
116	30	1,0	3,65 x 10 ⁵	1,89 x 10 ⁵	48,22
116	40	1,0	3,18 x 10 ⁵	1,28 x 10 ⁵	59,75
116	50	1,0	2,78 x 10 ⁵	1,09 x 10 ⁵	60,79
121	50	1,3	2,32 x 10 ⁵	5,50 x 10 ⁴	76,29
121	60	1,3	6,16 x 10 ⁵	4,20 x 10 ⁴	92,47
125	0	1,6	3,26 x 10 ⁶	2,43 x 10 ⁵	25,46
125	10	1,6	6,54 x 10 ⁵	2,62 x 10 ⁵	59,94
125	20	1,6	3,42 x 10 ⁵	2,93 x 10 ⁵	14,33
125	30	1,6	2,70 x 10 ⁵	1,82 x 10 ⁵	32,59
125	40	1,6	2,65 x 10 ⁵	1,41 x 10 ⁵	46,79
125	50	1,6	2,89 x 10 ⁵	4,80 x 10 ⁴	83,39
134	0	2,3	2,56 x 10 ⁵	1,02 x 10 ⁵	60,16
134	10	2,3	1,96 x 10 ⁵	6,10 x 10 ⁴	68,88
134	20	2,3	3,07 x 10 ⁵	1,69 x 10 ⁵	44,95
134	30	2,3	3,01 x 10 ⁵	0	100,00
134	30	2,3	1,73 x 10 ⁵	0	100,00
134	30	2,3	5,31 x 10 ⁵	0	100,00
134	40	2,3	2,00 x 10 ⁵	0	100,00
134	50	2,3	3,93 x 10 ⁵	0	100,00

Fonte: autor

O tempo de exposição refere-se ao tempo de contato que a amostra ficou exposta apenas à temperatura máxima. As linhas sombreadas trataram-se dos ensaios em triplicata para validação dos resultados quando encontrada a condição ideal.

Foi objetivado trabalhar com 100% de inativação, pois somente assim seria possível garantir a esterilização do resíduo. Quando se atinge essa fração, significa que o valor de N é zero. Com isso ficou impossível transferir os resultados das recuperações para a equação $\ln(N_0/N)$, que apresentaria erro.

Analisando a Tabela 5.13 notou-se que houve uma variação na recuperação de endósporos, o que afeta o resultado das frações. Por exemplo, a 125°C em 10 min de exposição, a inativação foi de 59,94%. Aumentando o tempo de exposição para 20 min a fração reduziu para 14,33%. Esses resultados podem ser explicados porque na primeira condição recuperou-se $6,54 \cdot 10^5$ e na segunda $3,42 \cdot 10^5$, e quando equacionados resultou em tal diferença.

Mas porque essa diferença na recuperação de endósporos? Qual o melhor método a ser adotado? Seria considerar para os cálculos apenas fatores exponenciais? O que se pode afirmar perante esses estudos é que o comportamento dos micro-organismos é diferente em cada situação, sendo que a perda de endósporos não será sempre a mesma. É impossível repetir minimamente 20 testes microbiológicos e ter 20 resultados de recuperação iguais. Por conseguinte, nesta pesquisa a média do número de micro-organismos recuperados da inoculação foi de $4,84 \cdot 10^5$ e o desvio padrão calculado também considerando as vinte e cinco recuperações feitas para obtenção do N_0 , 22 testes mais 3 recuperações das triplicatas, resultou em $5,88 \cdot 10^5$. Ou seja, a variação de N_0 oscilou entre $1 \cdot 10^5$ e $1 \cdot 10^6$ UFC.

O fato de ter objetivado os 100% de fração de inativação colaborou para eliminar incertezas. Só foi considerada condição ideal aquela que proporcionou um produto igual à zero UFC.

Abaixo segue o Gráfico 5.9 com os indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição estabelecidos sob a condição de temperatura máxima de trabalho de 116°C.

Observando o gráfico nessa situação visualizou-se que a partir de 30 min de contato a inativação teve aumento gradual e antes desse tempo houve variações de 20% aproximadamente.

Gráfico 5.9 – Indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição a 116°C

Fonte: autor

O Gráfico 5.10 apresenta os indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição estabelecidos sob a condição de 125°C.

Gráfico 5.10 – Indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição a 125°C

Fonte: autor

Sob essa condição observou-se que a partir de 20 min de contato a inativação já teve aumento gradual, considerando que antes desse tempo houve variações de 45% aproximadamente.

Por fim, o Gráfico 5.11 apresenta os indicadores das frações de inativação na condição de maior temperatura e pressão de vapor em relação aos tempos de contato.

Gráfico 5.11 – Indicadores das frações de inativação nos tempos de exposição a 134°C

Fonte: autor

Ao visualizar esses dados, percebeu-se que após 20 min de esterilização o aumento da fração de inativação foi gradual até os 30 min. Após isso se tornou constante. Entre os tempos de 10 e 20 min, a fração teve uma redução aproximada de 20%.

Para uma melhor comparação dos resultados, o Gráfico 5.12 apresenta os indicadores das frações de inativação em todas as condições estudadas, exceto para a temperatura de 121°C.

O objetivo de autoclavar o resíduo a 121°C foi apenas para verificar se a fração de inativação seria satisfatória nas condições mais utilizadas para esterilização de materiais e RSS do Grupo A1 em estabelecimentos de saúde. Por isso os testes foram feitos apenas com tempos de contatos maiores (50 e 60 minutos). As frações de 76 e 92% de inativação para essas situações representou a ineficiência do tratamento nessa temperatura e pressão absoluta (1,3 kgf/cm²). Não foram encontrados trabalhos científicos que comprovem a eficiência da esterilização nessa circunstância, apesar do Ministério da Saúde (2010) preconizar essa condição (121°C à 50 minutos) como ideal para esterilização de bolsas de sangue, pois em Hossain *et al.* (2012) as bactérias (células vegetativas) voltaram a se reproduzir após autoclavagem e suposta inativação. Utilizaram 121°C durante 15 minutos para bactérias gram-negativas, e 121°C durante 60 minutos para gram-positivas. Ressalta-se que *G. stearothermophilus* é gram-positiva e a presente pesquisa trabalhou com endósporos, que são

mais resistentes. Acredita-se que para cada contaminante têm-se a condição específica favorável à inativação.

Gráfico 5.12 – Comparativos dos indicadores das frações de inativação nas condições estudadas

Fonte: autor

Analisando as três condições observou-se que até os 30 primeiros minutos de exposição houve variações com diminuição da fração de inativação mesmo aumentando o tempo, mas a partir disso, a inativação passou a ter um aumento gradual até atingir o 100% esperado. Nas temperaturas maiores, 125°C e 134°C, o aumento da fração consolidou-se aos 20 min. A partir desses resultados, sabendo-se que *G. stearothermophilus* é uma bactéria termofílica que cresce a 60°C e que o fato das UFC estarem na forma de endósporos lhes conferem maior resistência, aponta-se a hipótese que antes desses tempos citados a oscilação na inativação aconteceu porque ainda estavam se reproduzindo, buscando por sobrevivência. A crescente morte das células só ocorreu a partir de certo tempo de exposição a temperaturas e pressões pré-estabelecidas.

5.5.2 A reprodução das *G. stearothermophilus* após tratamento

Baseado em Hossain *et al.* (2012), que constatarem o crescimento de bactérias dois dias após o tratamento com autoclave e concluíram que algumas das bactérias sobreviventes voltaram a se reproduzir mesmo após a exposição ao calor úmido, foram realizados testes para

comprovação se realmente havia encontrado a condição otimizada para inativação microbiana.

Esses foram feitos em triplicatas para avaliação se os micro-organismos voltavam a se reproduzir quando expostos à temperatura ambiente, ou seja, se mesmo após tratado o RSS poderia oferecer risco de contaminação. Observou-se tal comportamento com 24 horas, 48 horas e 5 dias, na condição ideal de inativação de 134°C à 30 min de exposição. Os ensaios de recuperação foram feitos decorridos tais tempos utilizando os mesmos métodos de filtração, plaqueamento e contagem.

A seguir são apresentados na Tabela 5.14 os resultados dos testes de reprodução das bactérias após tratamento em condições otimizadas.

Tabela 5.14 – Teste de reprodução de *G. stearothermophilus* após o tratamento

Triplicata	Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)	Tempo para recuperação	N_{inoculados} (N₀)	N_{final} (N)	Fração de inativação (%)
1	134	30	24 horas	$2,20 \times 10^5$	0	100
1	134	30	48 horas	$2,20 \times 10^5$	0	100
1	134	30	5 dias	$2,20 \times 10^5$	0	100
2	134	30	24 horas	$3,11 \times 10^5$	0	100
2	134	30	48 horas	$3,11 \times 10^5$	0	100
2	134	30	5 dias	$3,11 \times 10^5$	0	100
3	134	30	24 horas	$6,32 \times 10^5$	0	100
3	134	30	48 horas	$6,32 \times 10^5$	0	100
3	134	30	5 dias	$6,32 \times 10^5$	0	100

Fonte: autor

O tempo para recuperação atribuiu-se ao tempo que as amostras de resíduos ficaram expostas em temperatura ambiente após terem sido autoclavadas. Uma recuperação de endósporos inoculados foi feita cada triplicata, o que justifica os valores iguais.

Esse estudo comprovou que a inativação nas condições otimizadas relacionadas acima esteriliza o resíduo, pois que uma vez que a inativação alcançou índices de 100% em todas as situações, nenhum micro-organismo voltaria a se reproduzir, todos os existentes foram inativados. Esses resultados contrapõem o que preconiza a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004, que estabelece o Nível III de inativação, ou seja, 99,99% como o ideal. Em Anvisa (2006) a autoclavagem é definida como tratamento térmico para desinfecção dos RSS. Porém, com essa pesquisa foi possível confirmar que se existir 0,01% de bactéria sobrevivente tem-se chance de reprodução, e multiplicados esses seres, aumenta o fator de risco de contaminação em áreas de aterros sanitários. Logo, os RSS devem receber um tratamento térmico, sem

combustão, seja por calor úmido ou seco, que esterilize o resíduo de forma a evitar riscos futuros de contaminação ambiental.

6 CONCLUSÕES

Certificou-se da necessidade de se otimizar o processo de tratamento dos RSS por autoclave para atender maiores eficiências na inativação dos micro-organismos, uma vez que constatada a falta de condições pré-estabelecidas como tempo, temperatura e pressão de vapor, e também por ser a tecnologia mais utilizada para tratamento de resíduos infectantes quando comparada com micro-ondas.

Sentiu-se a necessidade de propor uma metodologia que permitisse avaliar o processo de maneira confiável e segura e que trouxesse resultados quantitativos de número de UFC mesmo perante os desafios encontrados para recuperação dos micro-organismos inoculados nas amostras de resíduos.

Durante, não só os ensaios piloto, mas também em todos os testes de recuperação dos endósporos com e sem autoclavagem, notou-se uma diferença (desvio padrão de $5,88.10^5$) no número de UFC recuperadas. Com isso, e perante conhecimentos sobre o comportamento dos micro-organismos que é variável frente a cada situação, o que se pode afirmar é que a perda de endósporos não será sempre a mesma, pois é impossível repetir minimamente várias vezes testes microbiológicos e obter sempre os mesmos resultados de recuperação. Procedimentos metodológicos foram estabelecidos nesse estudo para um controle desse desvio, como a padronização dos testes com autoclavagem de amostras de RSS úmidas a 5%.

Com os resultados alcançados nessa pesquisa, utilizando autoclave para tratamento de RSS a 121°C por 50 e 60 min, e também com os resultados obtidos por Hossain *et al.* (2012), foi possível concluir que nessa temperatura os resíduos não são esterilizados. A fração de inativação encontrada na presente pesquisa não foi satisfatória nas condições mais utilizadas para esterilização de materiais e de resíduos submetidos a tratamento prévio em estabelecimentos de saúde.

A partir de 121°C constatou-se que o saco para autoclave, utilizado para armazenar materiais dentro do equipamento durante o processo, entra em ponto de fusão, ou seja, derrete. Questiona-se qual seria então a finalidade do saco para autoclave e se esse não deveria ser substituído por outro instrumento mais adequado.

Com a relação do número de micro-organismos recuperados (N_0) e sobreviventes (N) obtidos com os testes de autoclavagem em variadas condições de tempo, pressão e temperatura, foi possível encontrar a condição otimizada do processo de tratamento. À temperatura de 134°C, a 2,3 kgf/cm² e 30 min de tempo de exposição a fração de inativação atingiu 100%. O fato de ter objetivado os 100% de fração de inativação colaborou para

eliminar incertezas, até mesmo sobre o risco oferecido ao meio ambiente após disposição dos rejeitos. Uma vez que é possível a esterilização, a desinfecção apenas passa a ser inapropriada, porém, é o que preconiza a Resolução Anvisa RDC nº 306/2004.

Observou-se, a partir dos resultados, o quão resistentes são as *G. stearothermophilus* considerando que o aumento da fração de inativação se deu somente após 20 min de exposição, em 125°C e 134°C, e 30 min em 116°C. Antes desses tempos a fração teve oscilações. Verifica-se a necessidade de maiores exigências na eficiência do tratamento de RSS nas unidades.

Não houve influência da fração volumétrica de ocupação da câmara sob variação de temperatura e consequente inativação microbiana, constatada através da instalação de cinco termopares na autoclave, que alcançavam superfície e interior da massa de resíduos. Isso para o caso dos RSS caracterizados no estudo e previamente triturados.

Os ensaios com reprodução dos micro-organismos mesmo após tratamento dos RSS em dias de exposição à temperatura ambiente comprovaram que em condição ideal para esterilização esses bioindicadores não se multiplicam, e o rejeito não ofereceria riscos de contaminação de aterro sanitário quando disposto.

Ter encontrado essas condições ideais para inativação dos micro-organismos e avaliado a autoclavagem nas circunstâncias deste estudo pode significar um grande avanço nas próprias unidades de tratamento, que terão um parâmetro estabelecido para trabalho. Ainda, órgãos regulamentadores como a Cetesb, Anvisa e Conama, poderão usufruir de uma técnica de avaliação da inativação de contaminantes biológicos em RSS confiável e eficaz ao licenciarem e certificarem unidades e equipamentos com essa especificidade.

7 RECOMENDAÇÕES

Para um aprimoramento e continuidade da pesquisa com tratamento térmico de RSS por calor úmido (sem combustão), sob as condições otimizadas definidas, ficam as recomendações para futuros trabalhos:

- Aplicar um modelo cinético, seguido da fundamentação de um modelo matemático, capaz de descrever a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em regime transiente não-isotérmico, uma vez que esta é a condição do processo em escala de laboratório e em escala real, e simular o processo de autoclavagem;
- Executar testes com avaliação do tratamento por autoclavagem em escala real, coletando resíduos na saída das unidades de tratamento de RSS e encaminhando para laboratório de microbiologia capaz de realizar os procedimentos conforme definições dessa pesquisa;
- Avaliar a eficácia na esterilização de materiais em estabelecimentos de saúde na temperatura de 121°C, conforme preconiza o Ministério da Saúde (2010), variando os endósporos de micro-organismos contaminantes e as condições de tempo de exposição.
- Analisar as condições otimizadas para esterilização no tratamento prévio, realizado dentro dos estabelecimentos geradores de RSS, dos resíduos do Grupo A₁. Considerar a proposta metodológica discutida neste estudo e as condições de 134°C, 2,3 kgf/cm² e 30 min para comparação.

Recomenda-se por fim, estruturar as normas legislativas para que avaliem quantitativamente a inativação de endósporos em unidades de tratamentos por autoclave, para fiscalização desse tipo de atividade, perante as condições otimizadas encontradas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABRELPE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2012**. São Paulo, 2013. 116 p.

ABRELPE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2015**. São Paulo, 2016. 92 p.

ANDRADE, J. B. L. **Análise do fluxo e das características físicas, químicas e microbiológicas dos resíduos de serviços de saúde**: proposta de metodologia para o gerenciamento em unidades hospitalares. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Resolução – RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004 DOU de 10/12/2004. Brasília, DF.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Saúde. **Manual de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Tecnologia em Serviços de Saúde**. Brasília, 2006. 185 p.

APHA. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environmental Federation. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Washington, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7500**: Símbolos de risco e manuseio para o transporte e armazenamento de material. Rio de Janeiro, 2000. 8 p.

_____. **NBR 9191**: Sacos plásticos para acondicionamento de lixo – Requisitos e métodos de ensaio. Rio de Janeiro, 2000. 7 p.

_____. **NBR 10004**: Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro, 2004. 71 p.

_____. **NBR 10005**: Procedimento para obtenção de extrato de lixiviado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004. 16 p.

_____. **NBR 10006**: Procedimento para obtenção de extrato de solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004. 3 p.

_____. **NBR 10007**: Amostragem de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004. 21 p.

_____. **NBR 12235**: Armazenamento de resíduos sólidos perigosos. Rio de Janeiro, 1992. 14 p.

_____. **NBR 12807**: Resíduos de serviços de saúde. Terminologia. Rio de Janeiro, 1993. 3 p.

_____. **NBR 12807**: Resíduos de serviços de saúde – Terminologia. Rio de Janeiro, 2013. 15 p.

_____. **NBR 12808**: Resíduos de serviços de saúde. Classificação. Rio de Janeiro, 1993. 2 p.

_____. **NBR 12808**: Resíduos de serviços de saúde – Classificação. Rio de Janeiro, 2016. 4 p.

_____. **NBR 12809**: Manuseio de resíduos de serviços de saúde. Rio de Janeiro, 1993. 4 p.

_____. **NBR 12809**: Resíduos de serviços de saúde – Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde intraestabelecimento. Rio de Janeiro, 2013. 14 p.

_____. **NBR 12810**: Coleta de resíduos de serviços de saúde. Rio de Janeiro, 1993. 3 p.

_____. **NBR 12810**: Resíduos de serviços de saúde – Gerenciamento extraestabelecimento – Requisitos. Rio de Janeiro, 2016. 12 p.

_____. **NBR 13853**: Coletores para resíduos de serviços de saúde perfurantes ou cortantes – Requisitos e métodos de ensaio. Rio de Janeiro, 1997. 4 p.

_____. **NBR 14652**: Coletor-transportador rodoviário de resíduos de serviços de saúde. Rio de Janeiro, 2001. 5 p.

_____. **NBR 14725**: Ficha de informações de segurança de produtos químicos – FISPQ. Rio de Janeiro, 2001. 9 p.

_____. **NBR 16457**: Logística reversa de medicamentos de uso humano vencidos e/ou em desuso – Procedimento. Rio de Janeiro, 2016. 9 p.

BRASIL. Congresso Nacional. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Brasília, DF.

BRASIL. Congresso Nacional. Regulamenta a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, cria o Comitê Interministerial da Política Nacional de Resíduos Sólidos e o Comitê Orientador para a Implantação dos Sistemas de Logística Reversa, e dá outras providências. Decreto nº 7.404, de 23 de dezembro de 2010. Brasília, DF.

CANDIAN, L. M.; DIAS, A. A. Estudo do polietileno de alta densidade reciclado para uso em elementos estruturais. **Cadernos de Engenharia de Estruturas**. São Carlos, v. 11, n. 51, p. 1 – 16, 2009.

CAVALIERI, L.F.; ROSENBERG, B. H. Hydrogen Bond Role in Denaturation of Nucleic Acids. **Journal of American Chemical Society**. v. 79, p. 5352 – 5357, 1957.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente através do teste com bioindicadores *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*. Norma Técnica P2.111, de junho de 2007. São Paulo, SP.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio. Norma Técnica L5.201, de janeiro de 2006. São Paulo, SP.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente: procedimento. Norma Técnica E15.010, de outubro de 2011. São Paulo, SP.

CHICK, H. An investigation of the laws of disinfection. **Journal of Hygiene**. v. 8, p. 92 - 158, 1908.

CHICK, H.; MARTIN, C. J. Heat Coagulation of Proteins. **Journal Physiology**. London, v. 40, p. 404 – 430, 1910.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Gerência de rejeitos radioativos em instalações radiativas. Norma Chen NE 6.05, de 17 de dezembro de 1985. Brasília, DF.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a revisão e complementação dos procedimentos e critérios utilizados para o licenciamento ambiental. Resolução nº 237, de 19 de dezembro de 1997 DOU de 22/12/1997. Brasília, DF.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre o tratamento e a destinação final dos resíduos dos serviços de saúde. Resolução nº 283, de 12 de julho de 2001. Brasília, DF.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos de serviços de saúde e dá outras providências. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Brasília, DF.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre o tratamento de resíduos sólidos provenientes de estabelecimentos de saúde, portos e aeroportos. Resolução nº 6, de 19 de setembro de 1991. Brasília, DF.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos. Resolução nº 316, de 29 de outubro de 2002. Brasília, DF.

CORRADINI, M. G. et al. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**. n. 106, p. 223-228, 2006.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. On modeling and simulating transitions between microbial growth and inactivation or vice versa. **International Journal of Food Microbiology**. n. 108, p. 22-35, 2006.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTA MARIA, L. C. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 13, n. 1, p. 1 – 13, 2003.

DALLES, R. N. **Avaliação da periculosidade dos resíduos de serviço de saúde dos grupos A e E provenientes de uma planta de tratamento por autoclavagem devido à presença de**

substâncias não voláteis no lixiviado. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

DALRYMPLE, O. K. et al. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. **Applied Catalysis B: Environmental**. n. 98, p. 27-38, 2010.

DENGCHAO, J.; ZHENBO, B.; XINPING, Y. Effects of Vacuum on Sterilizing Rate in Medical Waste Steam Treatment Process. **Procedia Environmental Sciences**. v. 11, p. 1407 – 1411, 2011.

DE VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 2. ed. v. 3. Athens: Springer, 2009.

DIDOMENICO, A. **Inactivation of Pathogenic Microorganisms in Infectious Medical Waste: A Literature Review of Current On-site Treatment Technologies.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Washington, Washington, 1993.

DOMINGUES, V. O. et al. **Contagem de Bactérias Heterotróficas na Água para Consumo Humano: Comparação entre Duas Metodologias.** Saúde, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 15 – 19, 2007.

DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes.** A handbook on the biology of bacteria. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3. ed. v. 4. Singapore: Springer, 2006.

FERREIRA, E. R. **Gestão e gerenciamento de resíduos de serviços de saúde pela administração pública municipal da UGRHI do Pontal do Paranapanema – SP.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

FRAIHA, M.; FERRAZ, A. C. O.; BIAGI, J. D. Determination of thermobacteriological parameters and size of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 30, n. 4, p. 1041 – 1045, 2010.

GALVÃO, M. A.; SILVA, J. C.; TEIXEIRA, M. C. Eficácia da descontaminação de resíduos biológicos infectantes de laboratórios de microbiologia após tratamento térmico por autoclavação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 18, n. 4, p. 323 – 331, 2013.

GARDNER, D. W. M.; SHAMA, G. The kinetics of *Bacillus subtilis* spore inactivation on filter paper by u.v. light and u.v. light in combination with hydrogen peroxide. **Journal of Applied Microbiology**. Loughborough, n. 84, p. 633-641, 1998.

GEANKOPOLIS, C. J. **Transport Processes and Separation Process Principle**. 4. ed. Prentice Hall, New Jersey, USA, 2003.

HEAD, D. S.; CENKOWSKI, S. Modelling of inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores exposed to superheated steam. **Canadian Biosystems Engineering**. v. 52, p. 3.1 – 3.10, 2010.

HOSSAIN, S. et al. Treatment of clinical solid waste using a steam autoclave as a possible alternative technology to incineration. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Basel, p. 855 – 867, 2012.

HUESCA-ESPITIA, L. C. et al. Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Applied Microbiology**. v. 121, 5. ed., p. 1300 – 1311, 2016.

IANNOTTI, M. T. **Inativação de esporos de *Bacillus atrophaeus* em Resíduos de Serviços de Saúde pela associação de ultravioleta com peróxido de hidrogênio**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

IANNOTTI, M. T.; PISANI JR, R. Inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste by uv light coupled with H₂O₂. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. São Paulo, v. 30, n. 3, 2013.

LAMBERT, R. J. W. A model for the thermal inactivation of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**. Bedfordshire, n. 95, p. 500 – 507, 2003.

LEVESPIEL, O. **Chemical Reactor Engineering**. 3. ed. John Wiley and Sons, New York, USA. 1999.

MACEDO, J. I. **Avaliação da eficácia da descontaminação de bolsas de sangue por autoclave**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Autoclavação como forma eficaz de inativação de micro-organismos em bolsas de sangue soropositivo**. Brasília, 2010. 106 p. il.

NAZINA, T. N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Great Britain, v. 51, p. 433 – 446, 2001.

OLIVEIRA, E. A. et al. Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste. **Waste Management**. v. 30, p. 2327 - 2335, 2010.

PATAZCA, E.; KOUTCHMA, T.; RAMASWAMY, H. S. Inactivation kinetics of *Geobacillus stearothermophilus* spores in water using high-pressure processing at elevated temperatures. **Journal of Food Science**. v. 71, n. 3, p. 110 – 116, 2006.

PISANI JR, R.; TONUCCI, L. R. S.; INOCENTINI, M. D. M. Inativação de *Pseudomonas aeruginosa* em resíduos de serviços de saúde por microondas. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 284 – 290, 2008.

PUGLIESI, E. **Estudo da evolução da composição dos resíduos de serviços de saúde (RSS) e dos procedimentos adotados para o seu gerenciamento integrado, no Hospital**

Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Carlos – SP. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RIBEIRO, A. B. **Elaboração, implementação e avaliação dos resultados obtidos com a execução de plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde em um hospital de pequeno porte.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

RIBEIRO, A. B.; PISANI JR, R. Método de obter a geração de resíduos de serviços de saúde para monitorar a execução do plano de gerenciamento de resíduos em um hospital. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales:** Investigación, desarrollo y práctica. Coyoacán, v. 5, n. 2, p. 11 – 27, 2012.

RIBEIRO, C. S. **Análise das tecnologias de tratamento de resíduos biológicos de serviço de saúde em hospitais públicos no município do Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2008.

SALOMÃO, I. S.; TREVISAN, S. D. P.; GÜNTHER, W. M. R. **Segregação de resíduos de serviços de saúde em centros cirúrgicos.** Nota Técnica. Engenharia Sanitária e Ambiental. Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 108 – 111, 2004.

SCHNEIDER, V. E. et al. **Manual de Gerenciamento de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde.** 1. ed. São Paulo: C. L. R. Balieiro, 2001. v. 1. 173 p.

SILVA, A. C. N. et al. Critérios adotados para seleção de indicadores de contaminação ambiental relacionados aos resíduos sólidos de serviços de saúde: uma proposta de avaliação. **Caderno de Saúde Pública.** Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1401 – 1409, 2002.

SOUZA, E. L. **Medidas para prevenção e minimização da contaminação ambiental e humana causada pelos resíduos de serviços de saúde gerados em estabelecimento hospitalar – estudo de caso.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

STAATT. A Report of the State and Territorial Association on Alternative Treatment Technologies. **Technical Assistance Manual:** State Regulatory Oversight of Medical Waste Treatment Technologies. Palo Alto, 1998. 103 p.

TONUCI, L. R. S.; PASCHOALATTO, C. F. P. R.; PISANI JR., R. Microwave inactivation of *Escherichia coli* in healthcare waste. **Waste Management.** v. 28, p. 840 - 848, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

XIONG, R. et al. A mathematical model for bacterial inactivation. **International Journal of Food Microbiology.** Leeds, n. 46, p. 45 – 55, 1999.

WEIL, R. R.; BRADY, N. C. **The nature and properties of soils.** 15. ed. New Jersey: Upper Saddle River, United States, 2016.

ZEVZIKOVAS, R. Gestão de Resíduos. **A Situação dos Resíduos de Serviços de Saúde.** Lixo hospitalar: cuidados e soluções. EFG editora, São Paulo, n. 4, p. 14 – 19, 2006.

**APÊNDICE A – GRÁFICOS OBTIDOS PELA RELAÇÃO TEMPERATURA E
TEMPO DE EXPOSIÇÃO DOS TESTES REALIZADOS**

Gráfico A1 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 11

Fonte: autor

Gráfico A2 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 12

Fonte: autor

Gráfico A3 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 13

Fonte: autor

Gráfico A4 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 14

Fonte: autor

Gráfico A5 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 15

Fonte: autor

Gráfico A6 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 16

Fonte: autor

Gráfico A7 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 19

Fonte: autor

Gráfico A8 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 20

Fonte: autor

Gráfico A9 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 6

Fonte: autor

Gráfico A10 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 7

Fonte: autor

Gráfico A11 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 8

Fonte: autor

Gráfico A12 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 9

Fonte: autor

Gráfico A13 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 10

Fonte: autor

Gráfico A14 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 17

Fonte: autor

Gráfico A15 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 1

Fonte: autor

Gráfico A16 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 2

Fonte: autor

Gráfico A17 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 3

Fonte: autor

Gráfico A18 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 4

Fonte: autor

Gráfico A19 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 5

Fonte: autor

Gráfico A20 – Relação temperatura e tempo de exposição referente ao teste 18

Fonte: autor

**ANEXO A – ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DA AUTOCLAVE DE BANCADA
UTILIZADA NO ESTUDO**

Autoclave Horizontal Linha AB - 14 litros

Autoclave Horizontal de Bancada Modelo AB. Equipamento utilizado para esterilização e secagem de materiais e utensílios diversos em clínicas odontológicas, médicas, postos de saúde e ambulatórios, dentre outros.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DE FABRICAÇÃO

- ✓ Com caldeira cilíndrica, horizontal construída em aço inoxidável AISI 304 polida com acabamento sanitário revestida externamente com material isolante ao calor, que além de otimizar o seu funcionamento, reduz o consumo de energia e não transfere calor ao ambiente.
- ✓ **Porta** em aço inoxidável AISI 304 fundido, com anel de vedação em borracha de silicone resistente a altas temperaturas. Possui dispositivo que impede o funcionamento do equipamento com a porta aberta. Sistema de fechamento da porta seguro, construído em aço inoxidável AISI 304 dotado de rolamento

que facilita o fechamento e diminui a prática de esforço físico. Possui **bandejas** confeccionadas em aço inoxidável AISI 304, totalmente perfuradas para permitir uma boa circulação do vapor, garantindo excelente qualidade na esterilização.

✓ **Gabinete** em chapa de aço carbono, com tratamento anticorrosivo e pintura eletrostática e revestimento frontal em chapas de poliestireno. Apresenta aberturas para ventilação.

✓ **Resistência** elétrica de imersão, blindada e fabricada em tubo de aço inoxidável.

✓ **Comando seguro**, confiável, desenvolvido com a mais moderna tecnologia em microcontroladores de 32Bits possui 10 programas de esterilização sendo: Pacotes, Caixas, Instrumentais Embalados, Instrumentais Desembalados, Vidraria, Líquidos, Termo Sensíveis, Flash, Teste Biológico e Usuário, possibilita programação da temperatura de esterilização, tempo de esterilização e de secagem sistema automático de eliminação de ar. Permite total configuração dos parâmetros protegido por senha, possibilidade de operar manualmente as saídas e entradas. Possui interface através de teclado de membrana e display gráfico com área de visão de 72 x 40mm para visualização dos parâmetros e fase do processo, com chave liga/desliga iluminada, manômetro correspondente a pressão (de 0 a 3,0 Kgf/cm²), pressão máxima de trabalho de 2,3 Kgf/cm², **Sistema eletrônico de segurança** que desliga automaticamente caso a temperatura exceda ou diminua a temperatura de ciclo programada. Excelente precisão e monitoramento no controle da temperatura, obtidos por meio de uma **termorresistência (PT-100)**. Equipamento de fácil instalação, não requer instalação hidráulica. Possui a necessidade de abastecimento para cada ciclo manualmente através de um Becker em polipropileno. **Opcional** transdutor de pressão para controle e indicação da pressão na caldeira.

✓ **Válvula de alívio** de pressão regulada para atuar com pressão igual ou superior à MPTA (máxima pressão de trabalho admissível). Sistema elétrico de segurança com fusível de proteção e termostato de segurança para evitar a queima das resistências e dos materiais em caso de falta de água.

✓ Equipamento de procedência nacional, registrado no Ministério da Saúde (**ANVISA**) sob nº. 80004710001, fabricada de acordo com normas ABNT NBR 11817:2001, ABNT NBR ISO 17665:2010, atende norma regulamentadora NR-13.

Modelo	Capacidade aproximada (litros)	Dimensões Internas Diam. x P (cm)	Dimensões Externas A x L x P (cm)	Potência (watts)	Nº de Bandejas:	Dimensões das bandejas L x P (cm)	Peso Líquido do Equipamento:	Tensão (Volts)
AB-14	14	23 x 35	35 x 51 x 54	1100	3	16 x 35	28 kg	127 ou 220