UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem

Rafael Queiroz de Souza

**Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de instrumentos
cirúrgicos enxaguados com diferentes qualidades de água**

São Paulo
2014

Rafael Queiroz de Souza

**Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de instrumentos
cirúrgicos enxaguados com diferentes qualidades de água**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano

**São Paulo
2014**

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

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Catálogo na Publicação (CIP)
Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Souza, Rafael Queiroz de

Avaliação in vitro da citotoxicidade de instrumentos cirúrgicos enxaguados
com diferentes qualidades de água. -- São Paulo, 2014.

109 p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano

Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

1. Enfermagem. 2. Oftalmologia. 3. Esterilização. 4. Água. 5. Biomateriais.
I. Título.

Nome: Rafael Queiroz de Souza

Título: Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de instrumentos cirúrgicos enxaguados com diferentes qualidades de água.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Nome:	Instituição:
-------	--------------

Julgamento:	Assinatura:
-------------	-------------

Nome:	Instituição:
-------	--------------

Julgamento:	Assinatura:
-------------	-------------

Nome:	Instituição:
-------	--------------

Julgamento:	Assinatura:
-------------	-------------

Nome:	Instituição:
-------	--------------

Julgamento:	Assinatura:
-------------	-------------

Nome:	Instituição:
-------	--------------

Julgamento:	Assinatura:
-------------	-------------

DEDICATÓRIA

*A minha avó **Maria Pereira dos Santos** (in memoriam).*

*A meu avô **Florentino Queiroz de Souza** (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, especialmente, à Escola de Enfermagem, por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional;

Ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA), pelo apoio e incentivo à produção científica;

Ao Instituto Adolfo Lutz, especialmente, ao Núcleo de Cultura de Células, pela colaboração e expertise nos ensaios de citotoxicidade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro na forma de bolsa e grant de bancada;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para compra de equipamentos e consumíveis;

À empresa Sterileno®, pela colaboração na realização das análises de endotoxinas;

À empresa MilliUni®, pela colaboração na determinação do Índice de sedimentos dissolvidos nas amostras de água;

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A meus pais e família, pela compreensão e paciência; este trabalho só foi possível pelo apoio de vocês;

À Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano, pela amizade, confiança, orientação e, sobretudo, pelas inúmeras discussões que resultaram, certamente, em uma das melhores fases de minha vida profissional;

À Profa. Dra. Silma Maria Cunha Pinheiro Ribeiro in memoriam, pela ajuda na concepção do projeto de pesquisa desta Tese;

À Profa. Dra. Áurea Silveira Cruz, pela parceria nas pesquisas e seriedade na condução dos ensaios de citotoxicidade;

Aos membros do grupo de pesquisa controle de infecção relacionado a procedimentos de assistência à saúde, especialmente à Alda Graciele Claudio dos Santos Almeida, Camila Quartim de Moraes Bruna e Maíra Marques;

À Enfa. Natacha Suemi Martins Tamashiro, pelo estudo de validação do procedimento operacional padrão utilizado nesta Tese;

À Profa. Dra. Michelle Alfa, pelas valiosas contribuições na finalização do projeto de pesquisa;

Às pesquisadoras Dra. Cláudia Regina Gonçalves, Dra. Tamiko Ichikawa Ikeda e colaboradores do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz, pelos ensaios de citotoxicidade;

*À **Profa. Dra. Maria Isabel Pedreira de Freitas**, pelas sugestões no exame de qualificação;*

*À **Profa. Dra. Maria Clara Padoveze**, pela parceria e apreciação do projeto nas reuniões do grupo de pesquisa;*

*À **Profa. Dra. Katia Grillo Padilha**, na condição de coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto, pelo apoio financeiro e incentivo;*

*À **Dra. Regina Affonso** (Diretora), **Dr. Getúlio Nishimori** (Responsável Técnico) e **Dr. Daniel Machado** (Farmacêutico) da empresa Sterileno®;*

*A **Dra. Karen Vickery**, pelas contribuições na finalização desta pesquisa;*

*E a **todos** que, diretamente ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento desta Tese.*

Este trabalho foi desenvolvido na Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, no Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) e com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Deus disse a Salomão: "Já que este é o desejo de seu coração e você não pediu riquezas, nem bens, nem honra, nem a morte dos seus inimigos, nem vida longa, mas sabedoria e conhecimento para governar o meu povo, sobre o qual o fiz rei, você receberá o que pediu, mas também lhe darei riquezas, bens e honra como nenhum rei antes de você teve e nenhum depois de você terá".

1 Reis 10:13

Souza RQ. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de instrumentos cirúrgicos enxaguados com diferentes qualidades de água [Tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2014.

RESUMO

Introdução: O Centro de Material e Esterilização (CME) deve garantir a remoção completa de resíduos orgânicos e inorgânicos, sobretudo detergentes e endotoxinas, dos produtos críticos para saúde por meio do enxágue suficiente com água de qualidade. Com base nos recentes relatos de síndromes tóxicas do segmento anterior ocular, que foram associadas às más práticas de processamento do instrumental de oftalmologia, especialmente, a qualidade da água utilizada em seu enxágue final, esta Tese teceu a hipótese de que quanto mais pura for a qualidade da água do último enxágue, menor será a citotoxicidade encontrada nos produtos para saúde. **Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade de cânulas de hidrodissecção submetidas à contaminação desafio, limpeza automatizada com enxágue final em diferentes qualidades de água: de torneira, tratada por deionizador, por destilação, por osmose reversa e por ultrapurificação. **Métodos:** 130 cânulas de hidrodissecção foram usadas, 26 por grupo experimental, caracterizados, de acordo com a água utilizada no último enxágue. As amostras foram submetidas à contaminação desafio interna e externamente por uma solução contendo 20% sangue de carneiro desfibrinado e 80% de Cloreto de Sódio a 0,9%, para simular um cenário desafiador de sujidade no material cirúrgico oftalmológico, sendo em seguida processadas, de acordo com um procedimento operacional padrão validado para este tipo de cânula, variando-se apenas a qualidade de água no enxágue final. Como controle positivo, foram utilizadas três cânulas descartáveis, que foram submetidas ao mesmo procedimento de contaminação desafio, imersas em uma solução contendo água de torneira e detergente enzimático que, após a evaporação da solução, foram esterilizadas. Para o controle negativo, foram usadas três cânulas das mesmas utilizadas nos grupos experimentais, com o mínimo de manipulação e na forma como foram fornecidas pelo fabricante, tendo sido apenas esterilizadas. Adicionalmente, foi incluído um grupo comparativo, no qual três amostras foram processadas em condições idênticas às dos grupos experimentais, enxaguadas com água de torneira, porém, sem secagem. Sequencialmente, procedeu-se a realização do teste de citotoxicidade pela incorporação do corante vital vermelho neutro para a obtenção da média da viabilidade celular de cada grupo experimental. **Resultados:** Ausência de citotoxicidade nos extratos das amostras, independente da diluição considerada na análise, sendo 83% a porcentagem média de viabilidade celular mínima obtida no extrato das amostras enxaguadas com água tratada por destilação na diluição de 12,5%. **Conclusão:** As cânulas de hidrodissecção não demonstraram citotoxicidade, independentemente da qualidade de água utilizada no último enxágue. Os resultados apresentados puderam ser alcançados unicamente por meio do uso de um procedimento operacional padrão de limpeza validado, baseado em literatura científica, em recomendações oficiais e na legislação relacionada.

PALAVRAS-CHAVE: Enfermagem. Oftalmologia. Centro de Material e Esterilização. Água. Materiais biocompatíveis.

Souza RQ. Assessment of *in vitro* cytotoxicity of surgical instruments rinsed with different qualities of water [Thesis]. São Paulo: School of Nursing, Universidade de São Paulo; 2014.

ABSTRACT

Introduction: The Central Sterile Supply Department (CSSD) must guarantee the complete removal of organic and inorganic waste, especially detergents and endotoxins, from critical medical devices through sufficient rinsing with good-quality water. Based on recent reports of toxic anterior segment syndromes, which were associated with poor processing practices of ophthalmology instruments, particularly the quality of water used in the final rinse, this thesis has raised the hypothesis that the better the quality of the water used in the last rinse, the lower the cytotoxicity found in medical devices. **Objective:** To evaluate the cytotoxicity of hydrodissection cannulas, that were submitted to contamination challenge and then automated cleaning with final rinse in different qualities of water: tap water, water treated by a deionizer device, by distillation, by reverse osmosis and by ultrapurification. **Methods:** 130 hydrodissection cannulas were used, 26 per experimental group, characterized according to the last rinse water used. The samples were submitted to internal and external contamination challenge using a solution containing 20% defibrinated sheep blood and 80% Sodium Chloride at 0.9%, to simulate a challenging scenario of soiled ophthalmic surgical material, which was then processed, according to a validated standard operating procedure for this type of cannula, changing only the quality of water at the final rinse. Three disposable cannulas were used as positive controls, being submitted to the same contamination challenge procedure, then immersed in a solution containing tap water and enzymatic detergent, and then sterilized after evaporation of the solution. Three cannulas, identical to those used in the experimental groups, were used as negative controls, after minimum handling and exactly as they were supplied by the manufacturer, having only been sterilized. Additionally, a comparison group was included, from which three samples were processed under conditions identical to the experimental groups, rinsed with tap water, but without drying. Sequentially, the cytotoxicity assay was performed by incorporating the neutral red vital dye to obtain mean cell viability from each experimental group. **Results:** We observed absence of cytotoxicity in the sample extracts, regardless of the dilution considered in the analysis, with 83% of minimal cell viability obtained in the sample extract rinsed with distilled water at 12.5% dilution. **Conclusion:** Hydrodissection cannulas showed no cytotoxicity, regardless of the quality of water used in the final rinse. The results shown here were achieved by using a validated cleaning standard operating procedure based on scientific literature, official recommendations and related legislation.

KEY-WORDS: Nursing. Ophthalmology. Central Sterile Supply Department. Water. Biocompatible Materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cânula de hidrodissecção utilizada como corpo de prova.	48
Figura 2 - Contaminação das amostras, com solução contendo 20% de sangue de carneiro desfibrinado e 80% de solução de Cloreto de Sódio a 0,9%	49
Figura 3 - Solução viscoelástica utilizada nos experimentos.....	50
Figura 4 - Cânulas de hidrodissecção, após contaminação desafio interna e externamente.	51
Figura 5 - Cânulas de hidrodissecção em pré-umectação.	52
Figura 6 - Lavagem do lúmen das cânulas de hidrodissecção com pistola de água sob pressão.....	52
Figura 7 - Aspiração do conteúdo das cânulas com seringa de 10 mL.....	53
Figura 8 - Lavadora ultrassônica utilizada na limpeza das amostras.....	53
Figura 9 - Cânulas de hidrodissecção adaptadas ao dispositivo de lavagem por refluxo.....	54
Figura 10 - Desobstrução do lúmen das cânulas de hidrodissecção por meio de hastes próprias, fornecidas pelo fabricante.	54
Figura 11 - Enxágue final do lúmen das cânulas de hidrodissecção.	55
Figura 12 - Secagem das cânulas de hidrodissecção por meio de ar comprimido filtrado.....	55
Figura 13 - Embalagem das cânulas de hidrodissecção, após processamento.....	56
Figura 14 - Autoclave utilizada na esterilização dos corpos de prova.	56
Figura 15 - Cânulas descartáveis para injeção de solução viscoelástica com resíduos depositados, utilizada como controle positivo.	57
Figura 16 - Destilador Cristófoli®.	61
Figura 17 - Deionizador de leite misto Purify®.....	62
Figura 18 - Tanque de armazenamento e equipamento, Milli-Q Direct8, empregados no armazenamento e tratamento da água por osmose reversa.....	63
Figura 19 - Ultrapurificador Milli-Q Direct8.	65
Figura 20 - Polidor BioPak®.	65
Figura 21 - Tubo de ensaio contendo a amostra em 2,8 mL de meio de cultura para extração.....	68
Figura 22 - Ultrassonicação dos tubos contendo as amostras e o meio de cultura para extração.....	69
Figura 23 - Layout utilizado nas microplacas para o método da captura do vermelho neutro.	70
Figura 24 - Centrífuga utilizada no preparo do meio de cultura.	71
Figura 25 - Leitor de microplacas utilizado na leitura das densidades óticas dos extratos das amostras.	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização das categorias de qualidade de água, de acordo com o limite tolerado de contaminantes.....	38
Quadro 2 - Indicação de uso de cada qualidade de água, de acordo com a classificação de Spaulding (1968) de produtos para saúde.....	38
Quadro 3 - Qualidade e função da água utilizada em cada estágio do processamento de produtos para saúde que serão submetidos à esterilização por vapor ou gases de baixa temperatura.....	39
Quadro 4 - Valores-limite para contaminantes de água, conforme a norma CSA Z314.8-08.*	40
Quadro 5 - Comparação da eficácia de várias tecnologias de purificação de água, em razão de cada contaminante.....	43
Quadro 6 - Qualidade da água utilizada no enxágue final dos grupos experimentais (G1 a G5).	51
Quadro 7 - Descrição dos grupos controle positivo, negativo e comparativo, de acordo com o número de amostras e processamento.	58
Quadro 8 - Referências metodológicas utilizadas nas análises para caracterização físico-química e microbiológica das qualidades de água utilizadas nesta pesquisa.	59
Quadro 9 - Caracterização microbiológica e físico-química da água de torneira, utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.	60
Quadro 10 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por destilação, utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.	61
Quadro 11 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por deionizador, utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.	62
Quadro 12 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por osmose reversa, utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.....	64
Quadro 13 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por ultrapurificação utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.....	66
Quadro 14 - Caracterização físico-química e microbiológica das qualidades de água utilizadas nesta pesquisa, em comparação com os valores limite da AAMI (2007).	67
Quadro 15 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 100%. São Paulo, 2014.....	74
Quadro 16 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 50%. São Paulo, 2014.....	75
Quadro 17 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 25%. São Paulo, 2014.....	75

Quadro 18 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 12,5%. São Paulo, 2014.....	76
Quadro 19 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 6,25%. São Paulo, 2014.....	76
Quadro 20 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G1 – Água de torneira, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.	77
Quadro 21 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G2 – Água tratada por destilação, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.....	77
Quadro 22 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G3 – Água tratada por deionizador, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.....	78
Quadro 23 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G4 – Água tratada por osmose reversa, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.....	78
Quadro 24 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G5 – Água tratada por ultrapurificação, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.....	79
Quadro 25 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do controle positivo do experimento, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.	79
Quadro 26 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do controle negativo do experimento, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.	80
Quadro 27 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do controle comparativo do experimento (sem secagem), em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.....	80
Quadro 28 - Contaminantes identificados no lavado do instrumental, de acordo com o período de utilização.	91
Quadro 29 - Contaminantes relacionados à corrosão do instrumental mensurados na entrada de vapor da autoclave.	91
Quadro 30 - Contaminantes relacionados à contaminação da carga mensurados no condensado do vapor na câmara.....	92
Quadro 31 - Sistema adotado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para categorização das recomendações.	98

LISTRA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AAMI</i>	<i>Association for the Advancement of Medical Instrumentation</i>
<i>ANSI</i>	<i>American National Standards Institute</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>AORN</i>	<i>Association of PeriOperative Nurses</i>
<i>APHA</i>	<i>American Public Health Association</i>
<i>ASCRS</i>	<i>American Society of Cataract and Refractive Surgery</i>
<i>ASORN</i>	<i>American Society of Ophthalmic Registered Nurses</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato, em português)</i>
<i>ATS</i>	<i>Artificial Test Soil</i>
<i>AWWA</i>	<i>American Water Works Association</i>
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
CaCO_3	Carbonato de Cálcio
<i>CDC</i>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cl^-	Cloreto
CME	Centro de Material e Esterilização
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>CCL</i>	<i>Certified Cell Line</i>
CO_2	Dióxido de carbono
<i>CSA</i>	<i>Canadian Standards Association</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico - ADN, em português)
DO	Densidade ótica
DOC	Densidade ótica do controle celular, composto de células e meio sem extrato
DOD	Densidade ótica encontrada em cada diluição
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz

IC ₅₀	Índice de citotoxicidade 50
ICP/OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente, em português)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
LEM-EE-USP	Laboratório de Ensaios Microbiológicos da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
LPS	Lipopolissacarídeos
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
P ₂ O ₅	Fosfato
NH ₄	Amônio
NO ₃	Nitrato
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução salina fosfatada, em português)
pH	potencial de Hidrogênio
POP	Procedimento Operacional Padrão
PROESA	Programa de pós-graduação em enfermagem na saúde do adulto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDI	<i>Silt Density Index</i> (Índice de densidade de sedimentos, em português)
SiO ₂	Silicato
SO ₄	Sulfato
TASS	<i>Toxic Anterior Segment Syndrome</i>
UV	Ultravioleta
WEF	<i>Water Environment Federation</i>

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µS	Microsiemen
cm	Centímetro
kHz	Kilohertz
L	Litro
m	Metro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MΩ	Megaohm
nm	Nanômetro
ppb	parte por bilhão
ppm	parte por milhão
RLU	<i>Relative Light Units</i> (unidades relativas de luz, em português)
RPM	Rotação por minuto
UE	Unidades de Endotoxina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
W	Watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 SÍNDROME TÓXICA DO SEGMENTO ANTERIOR OCULAR E O PROCESSAMENTO DE MATERIAL	24
2.2 SÍNDROMES TÓXICAS DECORRENTES DE RESÍDUOS DE DETERGENTES	29
2.3 SÍNDROMES TÓXICAS DECORRENTES DE ENDOTOXINAS	32
2.4 QUALIDADE DA ÁGUA PARA PROCESSAMENTO DE PRODUTOS PARA SAÚDE.....	34
2.4.1 Categorias de qualidade da água	37
2.4.2 Sistemas de purificação da água	41
3 OBJETIVO.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 TIPO DE PESQUISA	47
4.2 LOCAIS DO ESTUDO	47
4.3 MÉTODO.....	48
4.3.1 Processamento das amostras	49
4.3.2 Processos de obtenção de água para enxágue dos grupos experimentais.....	58
4.3.2.1 Grupo G1 – Água de torneira.....	60
4.3.2.2 Grupo G2 – Água tratada por destilação.....	60
4.3.2.3 Grupo G3 – Água tratada por deionizador	61
4.3.2.4 Grupo G4 – Água tratada por osmose reversa	63
4.3.2.5 Grupo G5 – Água tratada por ultrapurificação	64
4.3.3 Análise comparativa dos contaminantes da água.....	66
4.3.4 Teste de citotoxicidade pela incorporação do corante vital vermelho neutro.....	67
5 RESULTADOS	74
6 DISCUSSÃO.....	82
7 CONCLUSÃO	95
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO	108

1.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A limpeza é o processo fundamental para a garantia da esterilidade do material utilizado na assistência à saúde (Alfa *et al.*, 1996, Graziano, 2003). Seu objetivo é a remoção de resíduos químicos, sangue, proteínas, endotoxinas e outras substâncias orgânicas, com consequente redução do número de microrganismos (Ribeiro, 2010). Pode ser manual, por meio da utilização de artefatos ou automatizada, por intermédio de lavadoras que empregam água sob pressão e lavadoras ultrassônicas. Em ambos os casos, indica-se o uso de detergentes, que são agentes auxiliares no desprendimento da sujidade aderida ao material (Graziano, 2003).

A importância do uso de detergentes é também reconhecida no modelo denominado ciclo de Sinner, que pressupõe o condicionamento da limpeza a quatro fatores: agente químico, no qual estão incluídos os detergentes, energia mecânica, temperatura e tempo de procedimento; sendo que a redução de um determinado fator pode ser compensada pelo aumento de outro (Vlková *et al.*, 2008) – em teoria (grifo meu), com base em autores que referem limitações do modelo, como a difícil aplicação a microrganismos formadores de biofilmes e outras situações específicas (Vlková *et al.*, 2008).

No Brasil, são comercializados detergentes com pH ácido, neutro e alcalino. Os detergentes com baixo pH são mais eficazes na remoção de sujidades inorgânicas e os de pH alto são indicados para a remoção de sujidades orgânicas, como gorduras e proteínas (Spry, 2008).

Há também detergentes que contêm em sua formulação uma ou mais enzimas. Conforme Alfa e Jackson (2001), as recomendações do uso de detergentes enzimáticos na limpeza de material utilizado na assistência à saúde são baseadas em sua capacidade de remover proteínas, lipídios e carboidratos. Estes produtos podem conter diversas combinações de proteases, lipases e amilases, que caracterizam sua natureza proteica.

O estudo de Lipscomb, Sihota e Keevil (2006) que utilizou técnicas de microscopia para a visualização de contaminantes de natureza proteica, microrganismos e endotoxinas em 260 instrumentos cirúrgicos, submetidos à limpeza em lavadoras, demonstrou que, embora os microrganismos e endotoxinas possam ser removidos do instrumental cirúrgico, a contaminação de natureza proteica pode permanecer. Desta forma, com o objetivo de prevenir a ocorrência de eventos adversos, a remoção de produtos de natureza proteica por meio do enxágue rigoroso é essencial.

Embora o enxágue seja considerado fundamental na remoção dos resíduos de detergente e sujidades, há autores que apontam riscos na realização do enxágue sem controle de qualidade da água, em razão da possibilidade de recontaminação do material limpo com endotoxinas. Gorbet e Sefton (2005) definem estas substâncias como lipopolissacarídeos (*LPS*), integrantes da membrana celular de bactérias Gram-negativas. Sua liberação ocorre quando há morte, divisão ou crescimento bacteriano. A presença de endotoxinas em material cirúrgico pode constituir risco, em razão de sua característica altamente estável ao calor, pois somente são inativadas a temperaturas acima de 180 °C, que superam as temperaturas de 121 °C a 134 °C empregadas na esterilização pelo vapor saturado sob pressão (Rutala, Weber, 2008).

Em contato com a corrente sanguínea, as endotoxinas podem desencadear febre, hipotensão, dispneia, coagulação intravascular disseminada, choque e sepse. Além desses sintomas, Johnston (2006) acrescenta que uma pequena quantidade de endotoxinas é suficiente para provocar síndromes tóxicas do segmento anterior ocular após um procedimento cirúrgico oftalmológico.

Com base nesses riscos, Alfa (2006) estabelece que todo produto classificado como crítico, conforme Spaulding (1968), deve receber um enxágue final com água livre de endotoxinas. Nesse caso, a autora determina a água de osmose reversa como ideal.

Apesar de haver equipamentos de lavagem com termodesinfecção em que o enxágue é realizado com água tratada por osmose reversa

proporcionada pelo próprio ciclo do equipamento, no cotidiano de um Centro de Material e Esterilização (CME), o enxágue do material é comumente realizado com água corrente de torneira. De forma geral, a situação observada era que pouca importância é dada ao enxágue e ao tipo de água utilizada. Com base nos recentes relatos de síndromes tóxicas do segmento anterior ocular, que foram associadas às más práticas de processamento do instrumental de oftalmologia, esta problemática suscitou questionamentos quanto à segurança do enxágue realizado nos CMEs.

Atualmente, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 15 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que o enxágue final de produtos críticos para saúde, utilizados em cirurgias de implantes ortopédicos, oftalmológicos, cirurgias cardíacas e neurológicas deve ser realizado com água purificada e determina o monitoramento e registro, com periodicidade definida em protocolo, da qualidade da água, com mensuração da dureza da água, pH, íons cloreto, cobre, ferro, manganês e a carga microbiana (Brasil, 2012).

Embora esta legislação seja clara em relação ao monitoramento da qualidade da água, ainda restam dúvidas quanto ao real impacto desses contaminantes na segurança do processamento, uma vez que a referida RDC não define o padrão mínimo de aceitabilidade da qualidade da água purificada, conforme o monitoramento exigido, gerando dúvidas na prática assistencial, sobretudo quanto à interpretação dos dados mensurados para que o risco seja reduzido.

De qualquer forma, com base no racional-teórico, esta Tese teceu como hipótese inicial de que quanto mais purificada for a água do último enxágue, menor será a citotoxicidade encontrada no instrumental cirúrgico.

2.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÍNDROME TÓXICA DO SEGMENTO ANTERIOR OCULAR E O PROCESSAMENTO DE MATERIAL

A *American Society of Cataract and Refractive Surgery (ASCRS)* e a *American Society of Ophthalmic Registered Nurses (ASORN)* definem a síndrome tóxica do segmento anterior ocular (*TASS - Toxic Anterior Segment Syndrome*), como a inflamação aguda da câmara anterior ou segmento do olho após cirurgia de catarata, a qual, entre outras causas, pode ser atribuída à presença de resíduos de detergentes no instrumental oftalmológico (Hellinger *et al.*, 2007).

De acordo com Mamalis *et al.* (2006), o processo inflamatório característico da *TASS* apresenta-se dentro de 24 horas, após a cirurgia de catarata, e é limitado ao segmento anterior do olho. Os sinais e sintomas assemelham-se aos de uma endoftalmite infecciosa e normalmente incluem visão turva, dor ocular e vermelhidão. Nos casos mais graves, pode haver dano permanente ao endotélio, edema macular cistoide, pupilas permanentemente dilatadas e danos permanentes à malha trabecular, resultando em glaucoma resistente, que demanda diversas cirurgias (Parikh, Edelhauser, 2003).

Em relação às práticas de processamento de material, Holland, Morck e Lee (2007) identificaram riscos para *TASS* relacionados à contaminação do instrumental por detritos ressecados, soluções viscoelásticas, resíduos de detergentes, endotoxinas, exotoxinas, contaminação durante a lavagem por ultrassonicação, limpeza inadequada e impurezas do vapor empregado na esterilização.

Cutler-Peck *et al.* (2010) realizaram um extenso trabalho em centros oftalmológicos nos Estados Unidos da América, Argentina, Brasil, Itália, México, Espanha e Romênia, com o objetivo de identificar os fatores de riscos mais comuns associados à ocorrência de *TASS*. Os autores realizaram

a análise retrospectiva de dados obtidos de 68 questionários sobre práticas de limpeza e reprocessamento do instrumental oftalmológico e produtos intra e extraoculares utilizados em cirurgias de catarata, disponibilizados no *website* da Sociedade Americana de Catarata e Cirurgia Refrativa (*American Society of Cataract and Refractive Surgery – ASCRS*), além dos dados de 54 visitas realizadas por membros da Força Tarefa contra o TASS (*TASS Task Force*) em centros que reportaram casos nos Estados Unidos da América. Os resultados dos questionários revelaram que 55 centros processavam o instrumental de oftalmologia separadamente. Em relação à qualidade da água para o enxágue final, 30 centros usavam água deionizada ou destilada, 22, água esterilizada apirogênica e 12, água de torneira. Em relação ao uso de detergentes enzimáticos, 36 utilizavam e 28, não. A lavagem por ultrassonicação era realizada por 43 centros. Destes, oito limpavam o equipamento a cada uso, 31 limpavam mais de uma vez ao dia, três relataram desconhecimento do procedimento de limpeza do equipamento e um centro afirmou não possuir protocolo para a limpeza do equipamento.

A reutilização da mesma solução para lavagem por ultrassonicação foi associada ao acúmulo da quantidade de endotoxinas produzidas por bactérias Gram-negativas (Kreisler *et al.*, 1992). No estudo, os autores identificaram *Klebsiella pneumoniae* em dois frascos de detergente (um já em uso e outro do mesmo lote, aberto para cultura bacteriológica) e também no banho da lavadora ultrassônica; ambos sem especificação do número de unidades formadoras de colônia. Além disso, foi constatada a presença de endotoxinas em quantidades superiores a 0,125 UE/mL, sem quantificação exata. Estes dados permitiram aos autores atribuírem um surto de inflamação pós-operatória em cirurgias de catarata à presença de endotoxinas na água da cuba da lavadora ultrassônica.

Embora o estudo supracitado tenha alertado para o problema na década de 1990, há ressalvas que devem ser feitas com base no conhecimento científico atual. No contexto do estudo, a água da cuba era utilizada por até 7 dias, fato inadmissível pelos atuais *guidelines*, dos quais cita-se o da ASCRS e ASORN (Hellinger *et al.*, 2007). Outra ressalva é o fato

do estudo não considerar a relevância da adoção de protocolos de limpeza validados, que devem incluir e descrever a realização do enxágue suficiente para assegurar a utilização do material.

Ainda durante as visitas realizadas no estudo de Cutler-Peck *et al.* (2010), os membros da Força Tarefa contra a TASS puderam observar diversas práticas de processamento não consonantes com procedimentos operacionais padrão (POPs) para o instrumental de oftalmologia, com destaque para o enxágue insuficiente de material com lúmen, limpeza inadequada do instrumental e utilização de detergentes em concentrações incorretas e às cegas.

Posteriormente, Bodnar, Cluoser e Mamalis (2012) publicaram um estudo no qual analisaram dados de 99 questionários provenientes dos Estados Unidos da América (EUA), Argentina, Itália, Espanha, México, Romênia, Brasil e Eslováquia, além de 71 visitas realizadas nos EUA. Neste estudo, observaram fatores de risco para TASS, como: pré-enxágue inadequado, uso de detergente enzimático e emprego de lavadoras ultrassônicas. Entretanto, algumas considerações devem ser feitas em relação à argumentação dos autores:

- Sobre o pré-enxágue inadequado: embora Tamashiro *et al.* (2013) tenham demonstrado a possibilidade de remover a solução viscoelástica ressecada após 50 minutos de contato com o instrumental; quaisquer medidas para evitar a aderência de matéria orgânica e inorgânica no material são válidas e devem ser implementadas, uma vez que favorecem o processo de limpeza. Neste aspecto, o *guideline* da ASCRS e ASORN é enfático.
- A respeito do uso de detergentes enzimáticos: na perspectiva dos autores, não se deve utilizar detergente enzimático no instrumental de oftalmologia em razão da toxicidade evidenciada por estudos realizados em coelhos e córneas humanas; além do risco do detergente residual no material enxaguado de forma insuficiente. Outro argumento apresentado é que estes são produtos destinados à remoção de matéria orgânica “pesada” e o material utilizado no

segmento anterior ocular adquire uma biocarga muito pequena, sendo facilmente removida pela limpeza manual – afirmação não apoiada em evidências experimentais. Refutando as assertivas dos autores, há estudos que invalidam a contraindicação destas soluções para material de cirurgia oftalmológica. Leder *et al.* (2012) evidenciaram que a resposta obtida pela injeção intraocular não foi reportada em pacientes que desenvolveram TASS: as quantidades de detergente extraídas do material de oftalmologia com lúmen são muito baixas para produzir resposta inflamatória. Tamashiro *et al.* (2013) demonstraram que o uso de detergentes enzimáticos em cânulas de cirurgia oftalmológica, seja para limpeza manual ou automatizada em lavadora ultrassônica, quando realizado dentro de um POP validado com enxágue suficiente devidamente quantificado, não é contraindicado, afirmação sustentada por testes de citotoxicidade.

- Sobre o uso de lavadoras ultrassônicas: este talvez seja o aspecto mais polêmico no processamento do instrumental oftalmológico. De acordo com o racional-teórico dos autores, a lavadora ultrassônica é destinada à remoção de matéria orgânica pesada, o que não se aplica ao material que entra em contato com o segmento anterior ocular, além de colonizar-se por bactérias Gram-negativas, elevando os riscos relacionados às endotoxinas. Sobre a limpeza manual defendida pelos autores, há que se considerar as recomendações clássicas de cuidados com material no CME, como as da *Perioperative Standards and Recommended Practices* publicadas pela *Association of PeriOperative Nurses - AORN* (2013). Estas recomendações reconhecem a lavadora ultrassônica, como um equipamento indicado para remoção de pequenas partículas em locais de difícil acesso no instrumental, particularmente, lúmens pequenos. Além disso, é utilizada somente, após a remoção matéria orgânica “pesada”. Observa-se que há um descompasso total entre a argumentação do estudo e aquilo que é posto como padrão ouro em limpeza no CME pela AORN. Outra polêmica na argumentação dos

autores é o aumento de endotoxinas no banho da lavadora. Trata-se de um argumento válido, apoiado pelo trabalho de Kreisler *et al.* (1992), porém com as ressalvas realizadas anteriormente. Outro estudo que dá sustentação a teoria do risco associado à lavadora ultrassônica é o de Ribeiro (2006), que utilizou a lavadora ultrassônica para a limpeza de cateteres de angiografia, encontrando quantidades progressivas de endotoxinas em oito ciclos realizados: primeiro ciclo - 0,933 UE/mL, quarto ciclo - 4,569 UE/mL e sétimo ciclo - 53,472 UE/mL; além de bactérias Gram-negativas. Embora estes dois estudos deponham contra a lavadora ultrassônica, o conhecimento atual permite a validação de protocolos de limpeza e das rotinas de troca da água associada à limpeza da cuba interna do equipamento, permitindo a utilização da lavadora de modo seguro.

Em 2012, cientes da problemática envolvendo a gênese e o manejo da TASS nos EUA, a *Food and Drug Administration (FDA)* elaborou o Programa Proativo da TASS, que estabeleceu cinco passos para diminuir e prevenir a TASS decorrente de produtos para saúde. Neste documento, a limpeza está listada como causa, com base nos resíduos remanescentes de detergente enzimático (Gottsch, Schein, 2012; Eydelman *et al.*, 2012).

Particularmente, presume-se que resíduos remanescentes de detergentes enzimáticos no material pronto para uso denotem enxágue insuficiente. Sendo assim, pode-se afirmar que a limpeza realizada de forma inadequada, como, por exemplo, quando o enxágue é negligenciado, pode comprometer a segurança no processamento do instrumental oftalmológico; justificando assim o último enxágue, como objeto de estudo desta Tese.

A escolha de instrumental para cirurgia oftalmológica de conformação complexa, como corpo de prova para avaliar o impacto do enxágue final com diferentes qualidades de água, está justificada pela ocorrência atual da TASS, como evento adverso mais evidente e desafiador, que está relacionado ao processamento de produtos para saúde no CME.

2.2 SÍNDROMES TÓXICAS DECORRENTES DE RESÍDUOS DE DETERGENTES

Em 1990, Breebaart *et al.* reportaram que 18 pacientes apresentaram síndrome tóxica, após a realização de cirurgias intraoculares. Após a análise de todas as soluções oculares utilizadas nesses procedimentos, constataram que todas estavam dentro dos limites de tolerância quanto à toxicidade. Entretanto, observaram que, no período em que os casos ocorreram, o CME havia mudado a concentração do detergente utilizado na lavagem por ultrassonicação de 0,4% para 4%, sendo 4% a 5% a recomendação do fabricante. O fato fomentou a hipótese de que as cânulas não foram enxaguadas, após a lavagem, e a toxicidade foi decorrente da presença dos resíduos do detergente utilizado. Os autores acreditam que estes foram os primeiros casos de síndromes tóxicas em razão da presença de resíduos de detergente descritos na literatura. Em 1990, Nuyts *et al.* evidenciaram a toxicidade relacionada ao componente alcoólico na formulação do detergente e recomendaram a realização de estudos sistemáticos para determinar um detergente seguro para a limpeza do instrumental oftalmológico.

Embora os detergentes sejam potencialmente tóxicos às células, é necessário destacar que há normas claras, orientando a realização do enxágue rigoroso, visando à remoção de resíduos do detergente, seja com enzimas, sem enzimas ou alcalino.

Em 2002, Parikh *et al.* avaliaram a capacidade do detergente enzimático Medline® causar danos teciduais e inflamação do segmento anterior. Para isso, utilizaram córneas de coelho, córneas humanas e testes *in vivo* em coelhos Nova Zelândia. Os resultados demonstraram que o produto causa, de acordo com a dose, edema de córnea e inflamação intraocular, salientando a importância do enxágue na remoção dos resíduos do detergente.

Quaisquer agentes utilizados, tanto na limpeza como na esterilização são capazes de provocar TASS, incluindo detergentes enzimáticos e não enzimáticos (Mamalis *et al.*, 2006). A toxicidade relacionada aos resíduos

de detergentes enzimáticos é atribuída às substâncias subtilisina e a α -amilase, que são inativadas somente a temperaturas que ultrapassem 140 °C (Mamalis *et al.*, 2006; Parikh, Edelhauser, 2003; Parikh *et al.*, 2002).

Parikh *et al.* (2002) esterilizaram um detergente enzimático em autoclave a 120 °C e evidenciaram que o procedimento foi insuficiente para inativar as enzimas. Considerando que as autoclaves de vapor operam a temperaturas que variam de 121 °C a 134 °C, o risco de infusão dos resíduos remanescentes de enzimas nas superfícies internas e externas do material ainda permanece, especialmente, quando é utilizado material com lúmen (Mamalis *et al.*, 2006). Desta forma, é essencial que medidas visando à segurança na utilização desses dispositivos sejam tomadas.

Apesar da literatura científica ser enfática quanto ao risco dos resíduos de detergente remanescentes no instrumental, há também argumentação contrária. O estudo de Leder *et al.* (2012) contesta os dados obtidos em estudos realizados em coelhos. Para os autores, que testaram os detergentes Medline® e Enzo®, a resposta obtida pela injeção intraocular destes produtos é grave, porém, não foram as mesmas reportadas em pacientes que desenvolveram TASS. Além disso, demonstraram experimentalmente que as quantidades de detergente extraídas de material de oftalmologia com lúmen equivalem a, aproximadamente, 20% da menor dose testada no referido estudo, que não evidenciou resposta inflamatória.

Em adição aos riscos relacionados aos resíduos de detergentes, há também riscos quanto à presença de soluções viscoelásticas em cânulas de oftalmologia. Mamalis *et al.* (2006), com base nesse fato, levantam duas hipóteses: a primeira, que os resíduos dessas soluções poderiam reter o detergente enzimático, que em um procedimento cirúrgico seria infundido no olho; e a segunda, que o resíduo da própria solução viscoelástica seja o agente tóxico.

A primeira hipótese é sustentada pela difícil remoção dos resíduos de soluções viscoelásticas constituírem um desafio adicional para o CME e, em geral, as cânulas utilizadas para a injeção destas soluções possuem diâmetros de poucos milímetros, aproximadamente, 0,5 mm; exigindo que o

CME tenha equipamentos capazes de realizar a limpeza eficaz e protocolos rigorosos de processamento para o instrumental de oftalmologia. Mathys, Cohen, Bagnell (2008) identificaram resíduos de solução viscoelástica desnaturada no tecido ocular. Desta forma, a hipótese apresentada por Mamalis *et al.* (2006) é válida e demanda que os CMEs utilizem protocolos de limpeza validados, além de rotinas de monitoramento de processos para prevenção de falhas na limpeza.

Já a segunda hipótese, é apoiada pelo estudo de Kim (1987), que evidenciou inflamação intraocular em pacientes que realizaram procedimentos com cânulas processadas com desinfetantes e esterilizadas pelo vapor. Para o autor, a solução viscoelástica não é removida completamente das cânulas, e é alterada quimicamente pela ação esterilizante. No próximo procedimento oftalmológico, o resíduo mistura-se à solução viscoelástica e é injetado no segmento anterior ocular, causando a inflamação.

Com o avanço do conhecimento, com destaque para os estudos de validação de protocolos de limpeza, os resultados do estudo de Kim (1987) devem ser interpretados com critério. Primeiramente, como o próprio autor pondera: produtos críticos para saúde que **não** podem ser limpos devem ser considerados de uso único. Em segundo lugar, em produtos passíveis de processamento, a limpeza deve ser realizada com base em procedimentos operacionais padrão com eficácia demonstrada que, no contexto do estudo, não foi um aspecto considerado. De acordo com o conhecimento contemporâneo, em estudos visando à segurança de produtos para a saúde passíveis de processamento, a adoção de procedimentos operacionais padrão de limpeza claros, factíveis e baseados em referencial teórico-científico atual é imprescindível.

Em 2007, a ASCRS e a ASORN publicaram o artigo intitulado *Recommended practices for cleaning and sterilizing intraocular surgical instruments*, no qual descrevem medidas, visando à prevenção da ocorrência de TASS. Entre as medidas, o referido *guideline* aponta que a importância do uso de detergentes enzimáticos na limpeza desse tipo de instrumental ainda

não foi estabelecida, mas, quando forem utilizados, devem ser removidos por meio do enxágue em volumes abundantes de água, seguidos do enxágue final com água destilada ou deionizada (Hellinger *et al.*, 2007). Este racional-teórico sugere que o problema não está relacionado ao uso do detergente, e sim à sua remoção que não recebe a atenção devida na rotina do CME.

Não há dúvidas quanto à importância do enxágue para a prevenção da TASS, porém percebe-se que não há parâmetros definidos, além do seguimento de procedimentos operacionais padrão de limpeza, que permitam afirmar que o enxágue realizado na prática seja capaz de isentar o material de risco relacionado à toxicidade.

2.3 SÍNDROMES TÓXICAS DECORRENTES DE ENDOTOXINAS

A esterilização visa à destruição dos microrganismos aderidos ao material, no entanto, não necessariamente elimina os microrganismos mortos, que permanecem no material, como resíduos capazes de provocar reações pirogênicas (Tessarolo *et al.*, 2006). Os LPS de parede celular ou endotoxinas são moléculas biologicamente ativas, que podem provocar reações que variam de calafrios a choque irreversível e morte (Kundsin, Walter, 1980).

As endotoxinas podem causar TASS (Johnston, 2006; Mamalis *et al.*, 2006), como também induzir a ocorrência de solturas assépticas em implantes ortopédicos, trazendo consequências graves aos pacientes (Greenfield *et al.*, 2005). Os estudos também apontam que a contaminação do instrumental de oftalmologia com endotoxinas pode ocorrer pela água do enxágue e pela água utilizada na geração do vapor empregado na esterilização, em razão do biofilme presente no reservatório das autoclaves.

Devido aos riscos de recontaminação do instrumental com endotoxinas, há autores que recomendam evitar o contato do material limpo com água de torneira, pele e artefatos de limpeza molhados. Além disso,

recomendam que os produtos para saúde sejam limpos, inspecionados, embalados e esterilizados no menor tempo possível, limitando o tempo para contaminação e crescimento bacterianos, com consequente redução do risco relacionado a endotoxinas (Kundsin, Walter, 1980; Tessarolo *et al.*, 2006). Mas, em razão da dinâmica de funcionamento da maioria dos CMEs no Brasil, esta é uma recomendação difícil de ser atendida.

Carricas *et al.* (2008) analisaram a água utilizada para a limpeza do instrumental e verificaram valores entre 10 e 20 UE/mL. Como não encontraram referência para o limite máximo de endotoxinas para a água destinada à limpeza do instrumental, os autores limitaram-se a descrever os achados. Entretanto, salientaram que, em números absolutos, os valores encontrados foram superiores ao limite máximo de 0,25 UE/ml de endotoxinas permitido em água para injeção.

Holland *et al.* (2000) levantaram a hipótese sobre a associação da ocorrência de ceratite lamelar difusa em pacientes submetidos à cirurgia ocular e à liberação de endotoxinas pelo biofilme presente no reservatório de autoclaves STATIM 5000 e AMSCO *Eagle* 10. A investigação do surto envolvendo 52 pacientes revelou a presença do biofilme de *Burkholderia picketti* no reservatório das autoclaves. A adoção de estratégias para o controle de biofilmes no reservatório das autoclaves de mesa, que incluíram a limpeza com água fervente, escovação e aplicação de álcool isopropílico a 70% resultaram na diminuição significativa dos casos.

Outro estudo envolvendo a contaminação do instrumental durante a esterilização pelo vapor é o de Martin e Dailey (2001), que determinaram os microrganismos e a quantidade de endotoxinas nos reservatórios de autoclaves de mesa destinadas à esterilização de material odontológico. Em análises realizadas durante 6 dias, a quantidade de colônias encontradas antes da limpeza do reservatório foi de 1.000 a 80.000 UFC/mL, com média de 2.300 UFC/mL. Após a limpeza do reservatório, o número de colônias variou de 0 a 50 UFC, com média de 12 UFC/mL, sendo *Pseudomonas aeruginosa* o microrganismo mais frequente. Em relação à concentração de endotoxinas, os resultados antes da limpeza revelaram a média 1.158

UE/mL, considerada inaceitável pelos autores, com base na concentração natural de endotoxinas na cavidade oral, que seria de cerca de 240 UE/mL. Além disso, os autores afirmam que, em razão da elevada concentração encontrada, o material poderia estar contaminado com endotoxinas. Desta forma, reforçam as recomendações de limpeza dos reservatórios desses equipamentos.

Os estudos demonstram que resíduos de detergentes e endotoxinas são tóxicos para os tecidos, e que a remoção dessas substâncias está diretamente relacionada com o enxágue.

Por esse motivo, esta Tese utilizou testes de citotoxicidade *in vitro* para avaliar as repercussões celulares de diferentes qualidades de água no enxágue final de produtos críticos para saúde. A escolha do teste de citotoxicidade *in vitro* tem como fundamento o contato dos produtos para a saúde com células vivas, caracterizando assim, a prática assistencial.

2.4 QUALIDADE DA ÁGUA PARA PROCESSAMENTO DE PRODUTOS PARA SAÚDE

A qualidade da água é essencial para assegurar o processamento do material. A *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI), por meio do documento *Technical Information Report 34* de 2007, determina a qualidade de água para o processamento de produtos para saúde.

De acordo com a referida associação, a utilização de água de qualidade imprópria está relacionada à ocorrência de eventos que podem comprometer a segurança dos pacientes. Estes eventos incluem:

- **Mal-funcionamento;** pela corrosão do material devido à presença de substâncias salinas na água, resultando na quebra do produto para saúde durante um procedimento. Além disso, pode haver obstrução de lúmens, em razão da presença de resíduos, uma vez que a eficácia de detergentes pode ser comprometida pelo uso de água imprópria;

- **Efeitos tóxicos e reações pirogênicas;** pela deposição de resíduos orgânicos, inorgânicos e endotoxinas nos produtos para saúde;
- **Infecções;** pela presença de contaminantes na água com capacidade de reduzir o efeito de agentes desinfetantes e esterilizantes, além de proteger os microrganismos do contato com esses agentes.

Desta forma, na qualidade da água destinada ao processamento de produtos para saúde, duas características devem ser observadas: o nível de microrganismos e o conteúdo orgânico e inorgânico (AAMI, 2007).

Em relação à **quantidade de microrganismos**, de forma geral, água utilizada no processamento, independentemente do estágio (pré-limpeza, limpeza, enxágue inicial pós-limpeza, enxágue final pós-limpeza), não deve aumentar a biocarga do material. Entretanto, o risco de eventos adversos associado ao número de microrganismos na água, depende do tipo de produto para saúde e sua utilização. Em produtos para saúde que entrarão em contato somente com tecidos intactos, o risco é baixo. Mas, é alto em produtos críticos para saúde, que entrarão em contato com a corrente sanguínea e outros tecidos estéreis. A quantidade de microrganismos é mensurada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de água (AAMI, 2007). A *Canadian Standards Association – CSA* - (CSA, 2008), mediante a norma Z314.8-08, que trata especificamente da descontaminação de produtos para saúde, destaca a importância do controle microbiológico da água, considerando que entre os tipos mais comuns de microrganismos encontrados em fontes de água estão micobactérias, como *M. avium* e *M. fortuitum*; *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*; *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacea* e espécies de *Legionella*. Esses microrganismos são patógenos oportunistas, ocorrendo, frequentemente, em biofilmes presentes nos encanamentos e esporadicamente liberados na água (CSA, 2008).

Sobre o **conteúdo orgânico e inorgânico**, estão relacionados à qualidade da água: a quantidade de endotoxinas, o carbono orgânico total, o pH, a dureza, os contaminantes iônicos, a resistividade e a temperatura (AAMI, 2007).

A quantidade de **endotoxinas** na água utilizada no processamento de produtos para saúde está relacionada sobretudo ao crescimento de bactérias Gram-negativas. Como não são substâncias inativadas pela desinfecção e esterilização, as endotoxinas caracterizam-se como risco para os pacientes (AAMI, 2007).

A presença de **carbono orgânico** é um indicador de que a água está contaminada com resíduos derivados de uma fonte viva, como microrganismos, animais e plantas. Estes resíduos promovem o rápido crescimento de microrganismos na água, além de interferirem na eficácia de detergentes, desinfetantes e esterilizantes (AAMI, 2007).

O **pH** da água pode afetar diretamente os produtos para saúde pela corrosão. Além disso, a água com um pH inadequado pode reduzir a eficácia de detergentes, desinfetantes e esterilizantes (AAMI, 2007).

A **dureza** da água está relacionada à presença de sais dissolvidos, sobretudo cálcio e magnésio, que se depositam após a evaporação, formando camadas minerais. A água de dureza elevada reduz significativamente a eficácia de detergentes e desinfetantes. A título de exemplo, os componentes da água dura podem unir-se aos surfactantes impedindo o desprendimento da sujidade. Além disso, podem causar incrustações em componentes de aquecimento em lavadoras e termodesinfetadoras, reduzindo as trocas de calor e aumentando o gasto de energia para o aquecimento da água. Estas incrustações também podem ocorrer nos produtos para saúde. Nesse caso, podem abrigar microrganismos e impedir o desprendimento completo da sujidade (AAMI, 2007). A dureza da água pode variar significativamente, de acordo com a região geográfica, necessitando de abrandamento para a diluição de detergentes e uso em equipamentos destinados a limpeza de produtos para saúde (CSA, 2008). A dureza da água é determinada pela mensuração da concentração de CaCO_3 (AAMI, 2007).

Os **contaminantes iônicos** mais relevantes para o processamento dos produtos para saúde são cloreto, ferro, cobre e manganês. A quantidade excessiva de cloreto pode causar pontos de corrosão, que podem permitir o

acúmulo de sujeira e microrganismos. O excesso de ferro, cobre e manganês, que são conhecidos como metais pesados, podem causar manchas no instrumental cirúrgico. A mensuração desses íons pode ser feita diretamente por meio da medida de suas concentrações individuais e indiretamente pela medida da resistividade da água, que avalia sua capacidade de resistir ao fluxo da corrente elétrica (AAMI, 2007).

A **temperatura** tem impacto direto na eficácia do processamento do material. De forma geral, a temperatura da água depende do estágio do processamento, das recomendações do fabricante dos agentes de limpeza e das especificações dos equipamentos empregados na limpeza (AAMI, 2007).

2.4.1 Categorias de qualidade da água

A AAMI (2007) estabelece quatro categorias de qualidade da água para o processamento de produtos para saúde.

- **Água potável:** destinada ao consumo humano, com base em parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos que atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereçam riscos à saúde (Brasil, 2011). No Brasil, a caracterização da água potável está descrita na Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.
- **Água mole:** água que recebeu um tratamento limitado para reduzir os íons cálcio e magnésio. O processo não reduz a quantidade de microrganismos, nem remove matéria orgânica.
- **Água deionizada:** água que recebeu um tratamento limitado para a remoção de material inorgânico. Assim como na água mole, o processo não reduz a quantidade de microrganismos, nem remove matéria orgânica.
- **Água de alta pureza:** água extensamente tratada pela combinação de diversos métodos (filtros de carvão ativado, abrandamento, deionização, osmose reversa ou destilação). Para assegurar a

remoção de microrganismos, matéria orgânica e inorgânica, uma filtração com porosidade $< 0,2 \mu\text{m}$ ocorre ao final do processo.

A caracterização de cada qualidade da água descrita pela AAMI (2007) está apresentada nos dados do Quadro 1.

Quadro 1 - Caracterização das categorias de qualidade de água, de acordo com o limite tolerado de contaminantes.

Contaminantes	Água potável	Água mole	Água deionizada	Água de alta pureza
Bactérias (UFC/mL)	< 200	< 200	< 200	≤ 10
Endotoxinas (UE/mL)	NA	NA	NA	< 10
Carbono orgânico total (mg/L)	$< 1,0$	$< 1,0$	$< 1,0$	$< 0,05$
pH	6,5 a 8,5	6,5 a 8,5	NA	NA
Dureza (CaCO_3 em ppm)	< 150	$< 10,0$	$< 1,0$	$< 1,0$
Resistividade ($\text{M}\Omega\text{-cm}$)	NA	NA	$> 1,0$	$> 1,0$
Sólidos dissolvidos totais (CaCO_3 em mg/L)	< 500	< 500	$< 0,4$	$< 0,4$
Íons				
Cloroeto (mg/L)	< 250	< 250	$< 1,0$	$< 0,2$
Ferro (mg/L)	$< 0,3$	$< 0,3$	$< 0,2$	$< 0,2$
Cobre (mg/L)	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,1$
Manganês (mg/L)	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,1$	$< 0,1$
Cor e turbidez	Incolor, límpida e sem resíduos	Incolor, límpida e sem resíduos	Incolor, límpida e sem resíduos	Incolor, límpida e sem resíduos

NA: Não se aplica.

Fonte: AAMI, 2007.

Cada qualidade da água tem indicação de uso específica para produtos críticos, semicríticos e não críticos (Quadro 2).

Quadro 2 - Indicação de uso de cada qualidade de água, de acordo com a classificação de Spaulding (1968) de produtos para saúde.

Materiais	Água potável	Água mole	Água deionizada	Água de alta pureza
Críticos	Pré-limpeza e limpeza	Pré-limpeza e limpeza	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	Enxágue
Semicríticos	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	Enxágue
Não críticos	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	Pré-limpeza, limpeza e enxágue	

Fonte: AAMI, 2007.

Há também recomendações específicas quanto à qualidade e função da água para cada etapa do processamento de produtos para saúde que serão submetidos à esterilização pelo vapor. Estas recomendações estão reproduzidas nos dados do Quadro 3.

Quadro 3 - Qualidade e função da água utilizada em cada estágio do processamento de produtos para saúde que serão submetidos à esterilização por vapor ou gases de baixa temperatura.

Estágio do Processamento	Função da água	Qualidade da água
1. Pré-limpeza do material utilizado pelos pacientes	Remover a sujidade mais grossa e assegurar que a sujidade não secará na superfície ou no lúmen do material.	A água potável pode ser utilizada, desde que não exceda à temperatura de 45 °C.
2. Limpeza com detergente	Remover a matéria orgânica e inorgânica que não foram removidas na pré-limpeza.	A água potável pode ser utilizada para a diluição do detergente, desde que seja compatível com o produto.
3. Enxágue inicial pós-limpeza	Remover resíduos de detergente e sujidade.	A água potável pode ser utilizada, desde que não exceda a temperatura de 45 °C. A água deve ser trocada duas ou três vezes para assegurar o enxágue completo do material. Para cada enxágue, deve ser utilizado um volume suficiente para a imersão completa. Se a imersão não for usual, outros meios, como as especificações de enxágue de lavadoras termodesinfectoras devem ser utilizados para a documentação do volume de água necessário para o enxágue.
4. Enxágue final pós-limpeza	Reduzir a afinidade pela deposição de substâncias presentes na água dura ou de endotoxinas.	Preferencialmente, a água de alta pureza. Apenas um enxágue final é necessário quando o enxágue inicial pós-limpeza for realizado com duas ou três trocas de água em volume suficiente para imergir completamente o material.

Fonte: AAMI, 2007.

A norma canadense CSA Z314.8-08 (CSA, 2008) estabelece que o CME deve solicitar aos fabricantes de produtos para saúde, indicações de métodos, equipamentos utilizados para descontaminação e tipos de detergentes, além de instruções específicas quanto à qualidade de água. Além disso, a água utilizada no CME deve ser caracterizada quanto aos contaminantes, visando à adequação dos sistemas de tratamento. Os valores-limite referenciados estão apresentados nos dados do Quadro 4.

Quadro 4 - Valores-limite para contaminantes de água, conforme a norma CSA Z314.8-08.*

Contaminante	Valor limite
Resíduos de evaporação	15 mg/L
Sílica	2 mg/L
Ferro	0,2 mg/L
Cádmio	0,005 mg/L
Chumbo	0,05 mg/L
Metais pesados	0,1 mg/L
Cloreto	3 mg/L
Fosfato	0,5 mg/L
Condutividade	50 µS/cm
pH	6,5 a 8
Aparência	Incolor, límpida, sem sedimentos
Dureza	0,1 mmol/L

*Conforme a CSA, estes valores são adaptados da norma CAN/CSA-ISO 11134.

Fonte: CSA Z314.8-08.

No Brasil, apesar da RDC ANVISA n. 15 não definir valores-limite para contaminantes da água (Brasil, 2012), o último enxágue dos produtos críticos para saúde deve ser realizado com água purificada. Entende-se que água purificada na referida legislação remeta ao preceituado na Farmacopeia Brasileira (2010, p. 587), que foi transcrito abaixo *ipsis litteris*:

Água purificada é a água potável que passou por algum tipo de tratamento para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos nessa monografia. É preparada por destilação, troca iônica, osmose reversa ou por outro processo adequado. Deve estar livre da adição de quaisquer substâncias dissolvidas. Geralmente é utilizada na preparação de medicamentos que não requeiram água estéril nem apirogênica, destinados ao uso não parenteral.

Na Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010), além do conceito de água purificada, estão dispostos os ensaios de pureza, que envolvem tanto análises físico-químicas como microbiológicas, das quais citam-se: acidez/alcalinidade, substâncias oxidáveis, condutividade, carbono orgânico total, amônio, cálcio, magnésio, cloretos, nitratos, sulfatos e contagem de microrganismos. Mas, há críticas quanto ao uso dessa definição:

- Conceitualmente, não se destina ao enxágue de produtos para saúde e não há considerações sobre a conservação do instrumental e a prevenção de síndromes tóxicas; ao contrário das recomendações internacionais, como AAMI (2007).

- Outra característica importante que deve ser ponderada é a das exigências de controle de contaminantes da RDC ANVISA n. 15, que não têm correspondência direta com os ensaios de pureza da Farmacopeia Brasileira. O fato é importante, uma vez que as instituições que realizam os controles de contaminantes exigidos pela RDC ANVISA n. 15 carecem de valores-limite para avaliar a qualidade da água, tendo como alternativa buscar padrões internacionais, como a AAMI (2007).

2.4.2 Sistemas de purificação da água

Um sistema de tratamento é composto de uma série estágios de purificação, que são projetados para eliminar um determinado grupo de contaminantes. A combinação de diversos processos é necessária, pois o emprego de uma única tecnologia é incapaz de remover de forma eficiente todos os contaminantes. As principais tecnologias destinadas à purificação da água são:

- **Filtros multimeios** – nestes equipamentos, a água passa por um tanque cilíndrico vertical, construído em fibra de vidro, aço-carbono ou aço inoxidável, com diversos meios filtrantes contendo, entre outros, seixos rolados, antracita e quartzo. Este é o primeiro estágio da purificação da água e é caracterizado pela remoção mecânica de partículas de até 15 µm em suspensão (Santos, Cruz, 2008).
- **Filtros de carvão ativado** – utilizados para eliminação de cloro por meio da formação de óxidos e remoção de matéria orgânica por intermédio da adsorção. Em razão dessa propriedade, apresenta como desvantagem a contaminação microbiológica do equipamento, exigindo procedimentos de sanitização (Santos, Cruz, 2008).
- **Troca iônica** – envolve a remoção de íons da água por meio do emprego de uma resina de troca iônica. As principais aplicações dessa tecnologia são a conversão da água dura em água mole, pela redução de cátions cálcio e magnésio, e a remoção de outros cátions

e ânions dissolvidos na água - desmineralização ou deionização (Santos, Cruz, 2008). Sistemas de purificação de água que empregam a troca iônica necessitam de monitorização da medida da resistividade para a detecção da exaustão da resina e consequente prevenção da contaminação da água com íons (Stewart, 2000).

- **Destilação** – envolve o aquecimento da água até a fase de vapor, visando à sua separação de outras substâncias não voláteis, e resfriamento do vapor, visando à sua separação de substâncias altamente voláteis. É um excelente processo para a remoção de bactérias e endotoxinas. Um sistema de purificação de água pode ser baseado em múltiplos processos de destilação (Stewart, 2000).
- **Microfiltração** – consiste na filtração por membranas com poros de 0,05 a 5 μm . Pode ser utilizada para a remoção de bactérias ou outras partículas (Stewart, 2000).
- **Ultrafiltração** – consiste na filtração por membranas que retém moléculas com peso molecular entre 1.000 a 200.000 Daltons. Pode ser utilizada para a remoção de proteínas, endotoxinas e compostos orgânicos de alto peso molecular. Tanto a microfiltração, como a ultrafiltração são empregadas para purificação de água deionizada (Stewart, 2000).
- **Osmose reversa** – nesse método, a água é forçada através de membranas que separam espécimes ionizados e substâncias com peso molecular acima de 100 a 200 Daltons. É um método eficaz, que, com base na água potável, é capaz de remover de 90 a 99% de partículas, íons, matéria orgânica, e microrganismos em apenas um processamento (Stewart, 2000). Suas membranas são compostas basicamente de poliamida e polisulfona microporosa, enroladas em espiral e revestidas de fibra de vidro ou resina (Santos, Cruz, 2008). Em razão do tamanho diminuto dos poros da membrana, a produção desse tipo de água pode ser lenta e limitada. O sistema requer manutenção periódica para remoção de biofilmes, depósitos minerais e matéria orgânica (Stewart, 2000).

- **Eletrodeionização** – remove substâncias fracamente ionizáveis e outros contaminantes não removidos pela osmose reversa, sendo os dois métodos utilizados em conjunto (Santos, Cruz, 2008).
- **Raios ultravioleta (UV)** – Os raios UV₂₅₄ e UV₁₈₅ são utilizados para purificação da água. O UV₂₅₄ é efetivo para quebrar ligações entre carbono, nitrogênio e hidrogênio, resultando na eliminação dos microrganismos pela desnaturação do ácido desoxirribonucleico - DNA. Em razão de seu poder de penetração no ar e na água, pode ser utilizado na desinfecção de água corrente e em água mantida em reservatórios. O UV₁₈₅, não só quebra ligações orgânicas, como também gera radicais livres que rapidamente oxidam moléculas orgânicas e inorgânicas, causando aumento da resistividade da água. As moléculas ionizadas podem ser removidas pela utilização da troca iônica (Stewart, 2000).

A eficácia de cada uma dessas tecnologias utilizadas na purificação de água está sintetizada nos dados do Quadro 5.

Quadro 5 - Comparação da eficácia de várias tecnologias de purificação de água, em razão de cada contaminante.

Tecnologia	Contaminantes								
	Íons	Silicatos	Bactérias	Orgânicos	Partículas	Gases	Pirógenos	Nucleases	Ácidos Nucleicos
Filtros de carvão ativado	P	P	P	B	P	P	P	P	P
Troca iônica	E	E	P	R	P	R	R	R	R
Destilação	B	R	E	B	E	R	E	R	R
Microfiltração	P	P	E	P	E	P	P	P	P
Ultrafiltração	R	R	E	R	E	P	E	E	E
Osmose reversa	B	B	R	E	E	P	R	P	P
Raios UV ₂₅₄ nm	P	P	B	P	P	P	P	P	P
Raios UV ₁₈₅ nm	P	R	B	E	P	P	P	R	R

P = Pobre, R = Razoável, B = Boa e E = Excelente.

Fonte: Stewart, 2000.

3.

Objetivo

3 OBJETIVO

Avaliar a citotoxicidade de cânulas de hidrodissecção submetidas à contaminação desafio, limpeza automatizada com enxágue final em diferentes qualidades de água: de torneira, tratada por destilação, por deionizador, por osmose reversa e por ultrapurificação.

4.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

Experimental laboratorial.

4.2 LOCAIS DO ESTUDO

- Laboratório de Ensaios Microbiológicos da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo (LEM-EE-USP), onde foi realizado o processamento das amostras. O LEM-EE-USP é um centro de referência em estudos de segurança no processamento de produtos para saúde, alcance de esterilidade, recuperação de carga microbiana em instrumental cirúrgico e barreira antimicrobiana de embalagens. Atua em diversas parcerias com laboratórios de renome, além de exercer papel de destaque na formação de recursos humanos nos níveis de mestrado, doutorado e iniciação científica.
- Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – onde foram realizados os testes de citotoxicidade. O Instituto Adolfo Lutz é reconhecido internacionalmente por sua competência para responder às ocorrências em sua área de atuação, tendo sido credenciado pelo Ministério da Saúde, como Laboratório Nacional em Saúde Pública e Laboratório de Referência Macrorregional. É um Centro de Referência para Controle de Qualidade Analítica de Micotoxinas e Resíduos de Pesticidas; Coordenador Nacional do Programa de Monitoramento de Matérias Estranhas em Alimentos, Centro de Referência Nacional para Diagnóstico Laboratorial da AIDS; Centro Colaborador da Organização Pan-Americana de Saúde - OPS nas áreas de arbovírus, vírus influenza e produção de imunobiológicos e Centro Colaborador da OPS para Culturas Celulares (IAL, 2010).

4.3 MÉTODO

Visando a simular o processamento de um material utilizado em cirurgia oftalmológica, com lúmen estreito e difícil de limpar, foram eleitas como amostras, cânulas de hidrodissecção com, aproximadamente, 4,0 cm de comprimento, 0,6 mm de diâmetro, 0,2 mm de abertura na porção distal achatada, constituídas de alumínio e utilizadas para injeção de solução viscoelástica (*Steel Inox®*, Brasil) – Figura 1. Este último detalhe *utilizadas para injeção de solução viscoelástica* caracteriza o alto risco deste dispositivo, uma vez que, por eluição, pode introduzir contaminantes diversos que tenham permanecido no lúmen para o segmento anterior do olho. Ressalta-se que nem todos os produtos críticos para saúde apresentam o mesmo risco de eventos adversos para o paciente. Por exemplo, os contaminantes presentes em um dispositivo destinado a aspiração não configuram o mesmo risco, quando comparados aos contaminantes de um dispositivo destinado a irrigação.

Figura 1 - Cânula de hidrodissecção utilizada como corpo de prova.

Fonte: Própria do autor.

O cálculo do tamanho amostral, realizado com auxílio de um profissional estatístico, foi baseado no efeito dos tratamentos na média de viabilidade celular dos grupos experimentais. Para tanto, utilizou-se o

desvio-padrão observado dentro dos grupos de 40%, sendo estimada uma magnitude do efeito de 0,387, sendo 0,4 o máximo que se deve assumir para o cálculo amostral (Cohen, 1988). Enfim, o tamanho amostral estimado foi de 130 unidades (26 por grupo experimental). O *software* estatístico utilizado para os cálculos foi o *G*Power*, na seção de testes F. O poder utilizado foi de 95% e o nível de significância de 5%.

4.3.1 Processamento das amostras

Assepticamente, as amostras foram submetidas à contaminação desafio interna e externamente por uma solução contendo 20% sangue de carneiro desfibrinado (Biotério Boa Vista®, Brasil) e 80% de Cloreto de Sódio a 0,9% (Baxter®, Brasil), para simular um cenário desafiador de sujidade orgânica no material cirúrgico oftalmológico. Para a realização deste procedimento, preparou-se a solução em um tubo de ensaio de 50 mL (Corning®, Estados Unidos da América - EUA), com altura suficiente para a imersão completa da amostra. Com auxílio de uma pinça esterilizada, as amostras foram imersas verticalmente, com o canhão para cima, por 5 segundos, permitindo o contato de todo o lúmen com o contaminante – Figura 2.

Figura 2 - Contaminação das amostras, com solução contendo 20% de sangue de carneiro desfibrinado e 80% de solução de Cloreto de Sódio a 0,9%.

Fonte: Própria do autor.

Em seguida, preencheu-se o lúmen da cada amostra com solução viscoelástica Metilcelulose 2% (*Visionary Medical Supplies*®, EUA) – Figura 3, amplamente utilizada em cirurgias oftalmológicas e de difícil remoção do instrumental, em razão de sua característica viscosa e sua capacidade de ressecar, formando crostas. No procedimento cirúrgico, a solução viscoelástica auxilia na manutenção da câmara anterior do olho durante o procedimento cirúrgico e protege os tecidos oculares dos danos causados pelo processo pela facoemulsificação, especialmente, as células endoteliais da córnea (Maar *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2010).

Figura 3 - Solução viscoelástica utilizada nos experimentos.

Fonte: Própria do autor.

As amostras permaneceram em contato com o contaminante por 50 minutos (tempo baseado na duração média de uma cirurgia oftalmológica) – Figura 4.

Figura 4 - Cânulas de hidrodissecção, após contaminação desafio interna e externamente.

Fonte: Própria do autor.

Decorrido esse tempo, as cânulas foram submetidas à limpeza e enxágue final com diferentes qualidades de água, constituindo cinco grupos experimentais (Quadro 6).

Quadro 6 - Qualidade da água utilizada no enxágue final dos grupos experimentais (G1 a G5).

Grupos experimentais	Número de amostras	Água utilizada no enxágue final
G1	26	Água de torneira
G2	26	Água tratada por destilação
G3	26	Água tratada por deionizador
G4	26	Água tratada por osmose reversa
G5	26	Água tratada por ultrapurificação

Os passos para a limpeza foram realizados com base no modelo validado por Tamashiro *et al.* (2013), que foi desenvolvido conforme o *guideline* publicado pela ASCRS e ASORN. O modelo recebeu alterações, de acordo com as recomendações do fabricante para conservação das cânulas de hidrodissecção. O Procedimento Operacional Padrão (POP) utilizado está descrito abaixo:

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA LIMPEZA DE CÂNULAS DE HIDRODISSECÇÃO

1) Pré-umectação em água de torneira por aproximadamente 5 minutos – Figura 5;

Figura 5 - Cânulas de hidrodissecção em pré-umectação.

Fonte: Própria do autor.

2) Lavagem do lúmen, utilizando-se pistola de água sob pressão até a desobstrução e fluxo contínuo por 5 segundos – Figura 6;

Figura 6 - Lavagem do lúmen das cânulas de hidrodissecção com pistola de água sob pressão.

Fonte: Própria do autor.

3) Aspiração do conteúdo da cânula com seringa de 10 mL, conforme orientação do fabricante – Figura 7;

Figura 7 - Aspiração do conteúdo das cânulas com seringa de 10 mL.

Fonte: Própria do autor.

4) Lavagem ultrassônica (*Medisafe*®, Inglaterra) com adaptação das amostras ao dispositivo de retrofluxo e detergente enzimático, contendo cinco enzimas (3M®, Brasil) por 15 minutos a 50 °C – Figura 8 e 9;

Figura 8 - Lavadora ultrassônica utilizada na limpeza das amostras.

Fonte: Própria do autor.

Figura 9 - Cânulas de hidrodissecção adaptadas ao dispositivo de lavagem por retrofluxo.

Fonte: Própria do autor.

5) Quando necessário, desobstrução do lúmen com hastes metálicas (*Steel Inox®*, Brasil), conforme orientação do fabricante – Figura 10;

Figura 10 - Desobstrução do lúmen das cânulas de hidrodissecção por meio de hastes próprias, fornecidas pelo fabricante.

Fonte: Própria do autor.

6) Enxágue, de acordo com a qualidade de água para o grupo considerado (10 mL para parte externa e com 20 mL para lúmen), por meio de uma seringa de 10 mL – Figura 11;

Figura 11 - Enxágue final do lúmen das cânulas de hidrodissecção.

Fonte: Própria do autor.

7) Secagem em ar comprimido filtrado - Figura 12;

Figura 12 - Secagem das cânulas de hidrodissecção por meio de ar comprimido filtrado.

Fonte: Própria do autor.

8) Embalagem individual em papel grau cirúrgico (Amcor®, Brasil) – Figura 13;

Figura 13 - Embalagem das cânulas de hidrodissecção, após processamento.

Fonte: Própria do autor.

9) Esterilização em autoclave (Tuttnauer®, Israel) a 135 °C por 5 minutos; com ciclos monitorados por integrador Classe 5 (3M®, Brasil) e indicador biológico *Attest* 1292 - (3M®, Brasil) – Figura 14.

Figura 14 - Autoclave utilizada na esterilização dos corpos de prova.

Fonte: Própria do autor.

Fonte adaptada com inclusão de orientações do fabricante das cânulas: Tamashiro *et al.*, 2013.

Como controle positivo, foram utilizadas três cânulas descartáveis para injeção de solução viscoelástica, evitando assim a obstrução e a inutilização das cânulas de hidrodissecção originais.

Estas cânulas foram submetidas ao mesmo procedimento de contaminação desafio e imersas em uma solução, contendo água de torneira e detergente enzimático com cinco enzimas (3M®, Brasil). A solução com as amostras imersas foi mantida em estufa (Fanem®, Brasil) para evaporação da solução e deposição dos resíduos de água, contaminante e detergente. A embalagem e a esterilização do grupo foram realizadas como nos grupos experimentais – Figura 15.

Figura 15 - Cânula descartável para injeção de solução viscoelástica com resíduos depositados, utilizada como controle positivo.

Fonte: Própria do autor.

Para o controle negativo, foram utilizadas três cânulas, as mesmas utilizadas nos grupos experimentais, com o mínimo de manipulação e na forma como vieram do fabricante, embaladas em papel grau cirúrgico e esterilizadas pelo vapor a 135 °C por 5 minutos.

Adicionalmente, foi incluído um grupo controle comparativo, no qual três amostras foram processadas em condições idênticas às do grupo G1 (água de torneira), porém, com supressão da secagem. A razão da

inclusão desse grupo foi verificar se a secagem influencia a citotoxicidade, pela suposição de que a água remanescente no lúmen das cânulas favorece a proliferação bacteriana, com consequente aumento na quantidade de endotoxinas ao final da esterilização.

Os grupos controle e comparativo estão sintetizados nos dados do Quadro 7:

Quadro 7 - Descrição dos grupos controle positivo, negativo e comparativo, de acordo com o número de amostras e processamento.

Grupos	Amostras	Processamento
Controle positivo	3	Contaminação desafio, imersão em solução de água de torneira e detergente enzimático com cinco enzimas, embalagem e esterilização.
Controle negativo	3	Sem processamento, embalagem e esterilização
Controle comparativo	3	Idem ao grupo G1 – Água de torneira, sem secagem.

Após a esterilização, as amostras foram encaminhadas ao Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz para a realização dos testes de citotoxicidade.

4.3.2 Processos de obtenção de água para enxágue dos grupos experimentais

Todas as qualidades de água apresentadas foram submetidas à caracterização físico-química e microbiológica. Os métodos utilizados na determinação dos valores estão representados nos dados do Quadro 8.

Quadro 8 - Referências metodológicas utilizadas nas análises para caracterização físico-química e microbiológica das qualidades de água utilizadas nesta pesquisa.

Análise	Referência metodológica*
Bactérias (UFC/mL)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> , versão online: bactérias heterotróficas, Seção 9215B, 2004.
Endotoxinas (UE/mL)***	Valores obtidos por meio do equipamento Endosafe PTS®, que utiliza como base o teste <i>Limulus ameocyte lysate</i> (LAL).
Carbono orgânico total (mg/L)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF – 21ª Edição (2005), <i>High temperature combustion method</i> .
pH**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 4500H, item B, potenciometria com eletrodo combinado (não pertence ao escopo de acreditação INMETRO CRL 0093).
Dureza (CaCO₃ em ppm)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 3120B, espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio – ICP/OES
Resistividade (MΩ-cm) / Condutividade**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 2510, condutimetria
Sólidos dissolvidos totais (CaCO₃ em mg/L)****	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 2540, gravimetria.
Índice de densidade de sedimentos	<i>American Society for Testing and Materials International – ASTM International. D 4189-07. Standard Test Method for Silt Density Index (SDI) of Water.</i>
Cloreto (mg/L)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 4110C, cromatografia iônica
Ferro (mg/L)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 3120B, espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio – ICP/OES
Cobre (mg/L)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 3113, espectrometria de absorção atômica – forno de grafite.
Manganês (mg/L)**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 3120B, espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio – ICP/OES.
Níquel**	<i>Standard methods for the examination of water and wastewater</i> – APHA – AWWA – WEF versão online, método 3120B, espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio – ICP/OES.

* Transcrições *ipsis verbis* dos laudos recebidos

** Análises realizadas pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (São Paulo, São Paulo, Brasil)

*** Análises realizadas pela empresa Sterileno® (Sorocaba, São Paulo, Brasil)

**** Análises realizadas pela empresa Milliuni® (Campinas, São Paulo, Brasil)

O detalhamento dos processos de purificação e a caracterização físico-química e microbiológica serão descritos a seguir, de acordo com a qualidade da água.

4.3.2.1 Grupo G1 – Água de torneira

A água utilizada foi obtida diretamente do sistema de abastecimento do LEM-EE-USP. Nenhum tratamento adicional foi dispensado à água. A caracterização desta qualidade de água está representada nos dados do Quadro 9:

Quadro 9 - Caracterização microbiológica e físico-química da água de torneira utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.

Contaminantes	Água de torneira
Bactérias (UFC/mL)	220
Endotoxinas (UE/mL)	4,70
Carbono orgânico total (mg/L)	< 1,00
pH	6,65
Dureza (CaCO ₃ em ppm)	22,7
Condutividade (µS/cm)	66,0
Sólidos dissolvidos totais (CaCO ₃ em mg/L)	<100
Índice de densidade de sedimentos	0,785
Cloreto (mg/L)	6,18
Ferro (mg/L)	< 0,1
Cobre (mg/L)	< 0,04
Manganês (mg/L)	< 0,01
Níquel (mg/L)	< 0,02
Cor e turbidez	Incolor, límpida e sem resíduos

4.3.2.2 Grupo G2 – Água tratada por destilação

A destilação foi realizada com base na água filtrada do LEM-EE-USP. Utilizou-se um destilador de bancada (Cristófoli®, Brasil) – Figura 16, que, de forma geral, é destinado à produção de água destilada para uso em autoclaves.

Figura 16 - Destilador Cristófoli®.

Fonte: Própria do autor.

O equipamento produz, aproximadamente, 3,8 L por hora e sem rejeito. A caracterização da qualidade de água está representada nos dados do Quadro 10:

Quadro 10 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por destilação utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.

Contaminantes	Água tratada por destilação
Bactérias (UFC/mL)	100
Endotoxinas (UE/mL)	0,101
Carbono orgânico total (mg/L)	< 1,00
pH	7,16
Dureza (CaCO ₃ em ppm)	< 1,50
Condutividade (µS/cm)	13,6
Sólidos dissolvidos totais (CaCO ₃ em mg/L)	< 100
Índice de densidade de sedimentos	0,660
Cloreto (mg/L)	< 1,00
Ferro (mg/L)	< 0,1
Cobre (mg/L)	< 0,01
Manganês (mg/L)	< 0,01
Níquel (mg/L)	< 0,02
Cor e turbidez	Incolor, límpida e sem resíduos

4.3.2.3 Grupo G3 – Água tratada por deionizador

A deionização foi realizada com base na água do sistema de abastecimento do LEM-EE-USP. Utilizou-se um deionizador de leito misto (Purify®, Brasil), no qual a água do sistema de abastecimento passa por um

filtro de carvão ativado e por uma coluna de resinas de troca aniônica e catiônica; com rendimento total (Figura 17).

Figura 17 - Deionizador de leito misto Purify®.

Fonte: Própria do autor.

O equipamento possui controle digital da condutividade máxima aceitável e emite alarmes sonoros, quando este é ultrapassado. A caracterização desta qualidade de água está representada nos dados do Quadro 11:

Quadro 11 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por deionizador utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.

Contaminantes	Água tratada por deionizador
Bactérias (UFC/mL)	530
Endotoxinas (UE/mL)	1,0
Carbono orgânico total (mg/L)	3,34
pH	NA
Dureza (CaCO ₃ em ppm)	< 1,50
Condutividade (µS/cm)	0,8
Sólidos dissolvidos totais (CaCO ₃ em mg/L)	< 100
Índice de densidade de sedimentos	0,993
Cloreto (mg/L)	< 1,00
Ferro (mg/L)	< 0,10
Cobre (mg/L)	< 0,01
Manganês (mg/L)	< 0,01
Níquel (mg/L)	< 0,02
Cor e turbidez	Incolor, límpida e sem resíduos

*NA – Não aplicável

4.3.2.4 Grupo G4 – Água tratada por osmose reversa

A obtenção desta qualidade de água foi realizada por meio do equipamento Milli-Q® Direct8 (Millipore®, EUA). Neste equipamento, a água da rede de abastecimento passa inicialmente por um filtro de carcaça e por um filtro de carvão ativado, sendo em seguida, pré-tratada por um cartucho Progard® e por um cartucho de osmose reversa. A água produzida é armazenada em um tanque com controle microbiológico realizado com luz ultravioleta – Figura 18.

Figura 18 - Tanque de armazenamento e equipamento, Milli-Q Direct8, empregados no armazenamento e tratamento da água por osmose reversa.

Fonte: Própria do autor.

A caracterização desta qualidade de água está representada nos dados do Quadro 12:

Quadro 12 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por osmose reversa utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.

Contaminantes	Água tratada por osmose reversa
Bactérias (UFC/mL)	150
Endotoxinas (UE/mL)	0,912
Carbono orgânico total (mg/L)	< 1,00
pH	NA
Dureza (CaCO ₃ em ppm)	< 1,50
Condutividade (µS/cm)	1,8
Sólidos dissolvidos totais (CaCO ₃ em mg/L)	< 100
Índice de densidade de sedimentos	0,700
Cloreto (mg/L)	< 1,00
Ferro (mg/L)	< 0,10
Cobre (mg/L)	< 0,01
Manganês (mg/L)	< 0,01
Níquel (mg/L)	< 0,02
Cor e turbidez	Incolor, límpida e sem resíduos

*NA – Não aplicável

4.3.2.5 Grupo G5 – Água tratada por ultrapurificação

O pré-tratamento ocorreu por meio das mesmas tecnologias utilizadas na produção da água de osmose reversa. A ultrapurificação foi realizada com base na água armazenada no tanque. Adicionalmente, a água de osmose reversa recebeu tratamento por uma resina de troca iônica Jetpore®, carvão ativado sintético e lâmpada ultravioleta, com emissão a 185 e 254 nm, para atingir uma resistividade de 18,2 MΩ-cm a 25 °C e um valor de carbono orgânico total abaixo de 5 ppb. Estes valores são monitorados pelo próprio equipamento (Figura 19).

Figura 19 - Ultrapurificador Milli-Q Direct8.

Fonte: Própria do autor.

A etapa final da purificação ocorreu por meio de um polidor BioPak®, que provê uma água livre de nucleases, proteases e endotoxinas (Figura 20).

Figura 20 - Polidor BioPak®.

Fonte: Própria do autor.

A caracterização desta qualidade de água está representada nos dados do Quadro 13:

Quadro 13 - Caracterização microbiológica e físico-química da água tratada por ultrapurificação utilizada no enxágue final das amostras. São Paulo, 2013.

Contaminantes	Água tratada por ultrapurificação
Bactérias (UFC/mL)	3
Endotoxinas (UE/mL)	< 0,05
Carbono orgânico total (mg/L)	0,002
pH	NA
Dureza (CaCO ₃ em ppm)	< 1,50
Condutividade (µS/cm)	0,055
Sólidos dissolvidos totais (CaCO ₃ em mg/L)	< 100
Índice de densidade de sedimentos	0,195
Cloreto (mg/L)	< 1,00
Ferro (mg/L)	< 0,10
Cobre (mg/L)	< 0,01
Manganês (mg/L)	< 0,01
Níquel (mg/L)	< 0,02
Cor e turbidez	Incolor, límpida e sem resíduos

*NA – Não aplicável

4.3.3 Análise comparativa dos contaminantes da água

Todas as tecnologias selecionadas, quando utilizadas isoladamente, apresentaram vantagens e limitações em relação aos contaminantes analisados, demonstrando a necessidade de adequação dos sistemas de tratamento de água, de acordo com os estabelecimentos de assistência à saúde. Desta forma, a variação observada nos valores era esperada e teve por função sinalizar o possível elemento envolvido na suposta citotoxicidade relacionada ao último enxágue. Para fins comparativos, os valores estão apresentados nos dados do Quadro 14, com os valores-limite da AAMI (2007):

Quadro 14 - Caracterização físico-química e microbiológica das qualidades de água utilizadas nesta pesquisa, em comparação com os valores limite da AAMI (2007).

Contaminantes	Valores-limite para contaminantes, conforme a AAMI (2007)				Valores obtidos nas qualidades de água utilizados na presente pesquisa				
	Água potável	Água mole	Água deionizada	Água de alta pureza	Água de torneira	Água tratada por destilação	Água tratada por deionizador	Água tratada por osmose reversa	Água tratada ultra-purificação
Bactérias (UFC/mL)	< 200	< 200	<200	≤ 10	220	100	530	150	3
Endotoxinas (UE/mL)	NA	NA	NA	< 10	4,700	0,101	1,000	0,912	< 0,050
Carbono orgânico total (mg/L)	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 0,05	< 1,00	< 1,00	3,34	< 1,00	0,002
pH	6,5 a 8,5	6,5 a 8,5	NA	NA	6,65	7,16	NA	NA	NA
Dureza (CaCO ₃ em ppm)	< 150	< 10,0	< 1,0	< 1,0	22,7	< 1,50	< 1,50	< 1,50	< 1,50
Resistividade (MΩ-cm)	NA	NA	> 1,0	> 1,0	NA	0,073	1,25	0,555	18,2
Sólidos dissolvidos totais (CaCO ₃ em mg/L)	< 500	< 500	< 0,4	< 0,4	<100	< 100	< 100	< 100	< 100
Cloro (mg/L)	< 250	< 250	< 1,0	< 0,2	6,18	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Ferro (mg/L)	< 0,3	< 0,3	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,10	< 0,10
Cobre (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,04	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Manganês (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

*NA – Não aplicável

4.3.4 Teste de citotoxicidade pela incorporação do corante vital vermelho neutro

Os testes de citotoxicidade são métodos que visam a determinar a resposta biológica de células de mamíferos *in vitro*, por meio de parâmetros biológicos definidos, constituindo uma tentativa de simular ou exagerar as condições de uso clínico, a fim de se evidenciar o risco tóxico (*International Organization for Standardization* [ISO] 10993-5, 2009). Nesta Tese, optou-se pelo método da incorporação do corante vital vermelho neutro, que utiliza como parâmetro a viabilidade celular.

Para estimar a possível diferença na porcentagem de viabilidade celular dos grupos experimentais e grupos controles, optou-se pela utilização do extrato das amostras na maior concentração possível. Desta forma, a extração foi realizada em volume suficiente para cobrir a amostra, que foi estabelecido em 2,8 mL de meio mínimo essencial de Eagle (*Sigma-*

Aldrich®, EUA) em solução salina balanceada de Earle, com L-glutamina e 5% de soro fetal bovino.

A seguir, os procedimentos foram realizados em cabine de proteção biológica (Veco®, Brasil), com técnica asséptica.

Para que a extração fosse realizada, inicialmente, cada amostra recebeu um *flush* interno com 2,8 mL de meio de cultura por meio de uma seringa de 5 mL esterilizada e foi acondicionada em um tubo de ensaio estéril contendo o meio de cultura utilizado como extrator – Figura 21.

Figura 21 - Tubo de ensaio contendo a amostra em 2,8 mL de meio de cultura para extração.

Fonte: Própria do autor.

Para assegurar o desprendimento de resíduos (Ribeiro, 2006), os tubos foram submetidos a três ciclos de ultrassonicação por 5 segundos – Figura 22 - (*Enge Solutions*®, Brasil), com frequência ultrassônica de 40 kHz e potência de 30 W, além de agitação orbital por 5 minutos (*Fanem*®, Brasil).

Após estes procedimentos, os tubos com as amostras foram mantidos por 24 horas em estufa (*Forma Scientific*®, EUA) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; atendendo às recomendações de Cruz (2003).

Figura 22 - Ultrassonicação dos tubos contendo as amostras e o meio de cultura para extração.

Fonte: Própria do autor.

O método da captura do corante vital vermelho neutro utilizado nesta Tese fundamenta-se no estudo de Cruz (2003): suspensões de células NCTC clone 929 [Célula L, derivada da linhagem L] (ATCC® CCL-1™), catalogada no acervo do Núcleo de Cultura de Células do IAL sob o número CCIAL020, na concentração de, aproximadamente, $2,5 \times 10^5$ /mL em meio mínimo essencial de Eagle em solução salina balanceada de Earle, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, foram semeadas em volumes de 0,2 mL em microplacas de 96 poços de fundo chato (TPP®, Suíça) e incubadas por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para formação da monocamada de células. Após o período de incubação, o meio de cultura foi desprezado e substituído por 0,2 mL de meio de cultura contendo as diluições dos extratos das amostras a 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. As microplacas foram novamente incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C, com 5% de CO₂. Todas as diluições foram testadas em triplicata.

Para assegurar a resposta celular a agentes citotóxicos e não citotóxicos, realizou-se um controle positivo e negativo em cada microplaca, nas diluições de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Como agente tóxico utilizou-se extrato de látex e como agente atóxico, extrato de papel filtro.

O *layout* utilizado para distribuição das amostras está representado na Figura 23:

Figura 23 - Layout utilizado nas microplacas para o método da captura do vermelho neutro.

Fonte: Própria do autor.

Após o tempo de incubação, o meio contendo as diluições foi desprezado e adicionado em cada poço, 0,2 mL de meio sem soro, contendo 50 µg de corante vermelho neutro. As microplacas foram novamente incubadas por 3 horas a 37 °C para permitir a captação do vermelho neutro pelas células vivas. Este meio foi preparado 24 horas antes da utilização e mantido em estufa a 37 °C. Antes do uso, o meio foi centrifugado a 1.500 RPM (Hettich®, Alemanha) – Figura 24 - durante 15 minutos para eliminação dos cristais formados.

Figura 24 - Centrífuga utilizada no preparo do meio de cultura.

Fonte: Própria do autor.

Ao término do período de captura, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com 0,2 mL de solução salina fosfatada (*PBS*) pré-aquecida a 37 °C e uma vez com 0,2 mL de solução aquosa a 40% de formaldeído e 1% de CaCl_2 , visando à remoção do corante não captado. Esta solução foi descartada, e 0,2 mL de solução aquosa de 1% de ácido acético e 50% de etanol foram adicionados para extrair o corante. Após 10 minutos de agitação, as microplacas foram encaminhadas para leitura da densidade ótica em um leitor de microplacas, com comprimento de onda de 540 nm, com filtro de referência 620 nm - Figura 25.

Figura 25 - Leitor de microplacas utilizado na leitura das densidades óticas dos extratos das amostras.

Fonte: Própria do autor.

O interesse deste estudo foi avaliar a média das porcentagens de viabilidade celular dos grupos experimentais, após o contato com os extratos das amostras. Nestes grupos, foram obtidas as densidades óticas (DO), constatadas por meio do leitor de microplacas. Em seguida, obteve-se a média das DOs das triplicatas e, sequencialmente, a viabilidade celular da amostra, que foi calculada da seguinte forma:

$$(\text{DOD} / \text{DOC}) \times 100 = \text{Viabilidade celular (\%)}$$

Onde:

DOD - Densidade ótica encontrada em cada diluição.

DOC - Densidade ótica do controle celular, composto de células e meio sem extrato.

Uma vez obtida a viabilidade celular de cada amostra, calculou-se a viabilidade celular média de cada grupo experimental em função da diluição do extrato, que foi utilizada na apresentação e discussão dos resultados.

O método empregado torna possível o cálculo do Índice de Citotoxicidade 50 (IC₅₀), ou seja, a concentração capaz de provocar a perda de 50% da viabilidade celular (Azevedo, Cruz e Pinto, 2006).

5.

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados demonstraram ausência de citotoxicidade nos extratos das amostras, independente da diluição considerada, sendo 83% a porcentagem média de viabilidade celular mínima obtida no extrato das amostras enxaguadas com água tratada por destilação na diluição de 12,5%. Isso posto, o cálculo do IC₅₀ não foi possível, uma vez que os extratos dos grupos experimentais avaliados apresentaram viabilidade celular superior a 50%.

Estes dados estão apresentados nos Quadros 15, 16, 17, 18 e 19; acompanhados dos desvios-padrão, valores máximos e mínimos; e medianas.

Quadro 15 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 100%. São Paulo, 2014.

Água de enxágue final	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Máximo (%)	Mínimo (%)	Mediana (%)
Água de torneira	99	6	108	80	100
Água tratada por destilação	91	15	121	64	90
Água tratada por deionizador	95	8	106	80	96
Água tratada por osmose reversa	98	8	116	83	98
Água tratada por ultrapurificação	100	6	106	75	101
Controle positivo	2	1	3	2	2
Controle negativo	97	2	99	94	97
Controle comparativo sem secagem	91	12	105	82	87

Quadro 16 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 50%. São Paulo, 2014.

Água de enxágue final	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Máximo (%)	Mínimo (%)	Mediana (%)
Água de torneira	101	4	106	86	101
Água tratada por destilação	89	15	117	67	89
Água tratada por deionizador	92	8	101	74	93
Água tratada por osmose reversa	92	9	111	68	92
Água tratada por ultrapurificação	96	7	105	73	98
Controle positivo	2	1	3	1	2
Controle negativo	96	0	96	95	96
Controle comparativo sem secagem	86	14	101	74	84

Quadro 17 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 25%. São Paulo, 2014.

Água de enxágue final	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Máximo (%)	Mínimo (%)	Mediana (%)
Água de torneira	98	5	105	85	100
Água tratada por destilação	86	16	118	62	86
Água tratada por deionizador	91	9	109	74	91
Água tratada por osmose reversa	92	10	116	70	93
Água tratada por ultrapurificação	95	7	107	78	96
Controle positivo	1	0	2	1	2
Controle negativo	92	1	94	91	92
Controle comparativo sem secagem	82	15	98	68	79

Quadro 18 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 12,5%. São Paulo, 2014.

Água de enxágue final	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Máximo (%)	Mínimo (%)	Mediana (%)
Água de torneira	96	7	106	83	98
Água tratada por destilação	83	15	112	58	85
Água tratada por deionizador	88	8	101	71	90
Água tratada por osmose reversa	88	8	105	75	88
Água tratada por ultrapurificação	93	7	106	75	94
Controle positivo	12	13	26	2	8
Controle negativo	90	6	95	84	91
Controle comparativo sem secagem	77	18	97	62	70

Quadro 19 - Média, desvio-padrão, valor máximo, valor mínimo e mediana das porcentagens de viabilidade celular obtidas no teste citotoxicidade de cada grupo experimental, com o extrato das amostras a 6,25%. São Paulo, 2014.

Água de enxágue final	Média (%)	Desvio-padrão (%)	Máximo (%)	Mínimo (%)	Mediana (%)
Água de torneira	95	8	109	73	98
Água tratada por destilação	84	16	116	58	82
Água tratada por deionizador	90	9	107	64	93
Água tratada por osmose reversa	91	9	106	75	92
Água tratada por ultrapurificação	93	7	105	77	94
Controle positivo	30	9	37	20	32
Controle negativo	92	5	96	86	94
Controle comparativo sem secagem	78	16	94	63	78

Nos controles positivos, foram observadas células sensíveis ao agente tóxico, com diminuição progressiva da citotoxicidade em função da diluição do extrato e ausência de citotoxicidade nos controles negativos, demonstrando a capacidade do método de atestar a citotoxicidade dos extratos das amostras.

Os dados dos controles positivos e negativos das microplacas estão representados nos Quadros 20, 21, 22, 23 e 24.

Quadro 20 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G1 – Água de torneira, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1	3	2	6	83	82	94	95	86	88	88
B	2, 3, 4, 5	3	3	10	89	101	97	95	93	95	77
C	6, 7, 8, 9	0	2	2	96	103	93	96	94	93	96
D	10, 11, 12, 13	3	0	3	102	105	99	102	96	101	96
E	14, 15, 16, 17	2	2	5	88	95	103	103	104	103	99
F	18, 19, 20, 21	2	3	3	68	102	100	100	109	106	99
G	22, 23, 24, 25	3	3	2	73	97	100	102	96	91	97
H	26	3	1	3	77	95	99	105	111	112	95

Quadro 21 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G2 – Água tratada por destilação, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1, 2	1	1	26	81	86	98	89	99	92	89
B	3, 4, 5	1	1	39	89	87	94	90	92	93	84
C	6, 7, 8	3	1	46	83	83	84	91	93	91	87
D	9, 10, 11	6	5	3	78	119	76	98	108	115	115
E	12, 13, 14	2	3	4	79	114	93	103	102	102	112
F	15, 16	3	3	4	76	105	79	91	95	97	98
G	17, 18, 19, 20	3	3	3	70	81	73	69	93	65	70
H	21, 22, 23	5	5	5	56	80	83	80	79	76	67
I	24, 25, 26	5	4	4	62	77	71	74	77	70	74

Quadro 22 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G3 – Água tratada por deionizador, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1, 2, 3, 4	3	1	3	79	85	83	91	85	89	74
B	5, 6, 7, 8	2	2	2	88	100	91	84	109	93	86
C	9, 10, 11	3	2	4	87	86	96	103	94	89	82
D	12, 13, 14, 15	3	3	5	81	87	88	91	88	88	82
E	16, 17	3	2	6	83	82	94	95	86	88	88
F	18	2	2	2	41	93	95	100	97	90	100
G	19, 20	1	1	3	46	95	92	93	95	94	95
H	21, 22, 23	4	2	5	48	104	98	102	102	102	102
I	24	5	4	3	66	82	89	91	97	82	92
J	25	1	1	26	81	86	98	89	99	92	89
K	26	0	3	1	53	96	93	101	102	98	100

Quadro 23 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G4 – Água tratada por osmose reversa, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1	5	4	3	66	82	89	91	97	82	92
B	4, 5, 6, 7	4	2	4	70	82	95	85	88	86	78
C	8, 9, 10, 11	4	4	4	78	82	82	88	86	94	99
D	12, 13, 14, 15	2	2	3	45	92	93	98	109	99	110
E	16, 17, 18, 19	2	3	4	40	74	86	86	87	82	93
F	20, 21, 22, 23	4	3	4	48	107	91	94	99	101	99
G	24	6	5	3	78	119	76	98	108	115	115
H	25	0	3	1	53	96	93	101	102	98	100
I	26, 27, 28	3	3	5	42	102	102	106	114	104	105

Quadro 24 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do grupo G5 – Água tratada por ultrapurificação, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1, 2, 3, 4	3	0	3	89	99	93	99	95	89	91
B	5, 6, 7	2	2	3	85	94	88	93	91	84	86
C	8, 9, 10, 11	3	3	3	99	97	98	101	98	102	100
D	12, 13, 14, 15	3	3	3	72	111	97	99	101	115	106
E	16, 17, 18, 19	2	2	1	75	99	94	96	93	93	89
F	20, 21, 22, 23	1	2	3	75	96	98	99	98	101	92
G	24	2	2	2	41	93	96	91	97	90	100
H	25	3	3	4	76	105	79	91	95	97	98
I	26	0	2	1	52	94	91	99	100	95	97

As mesmas constatações quanto à sensibilidade do teste de citotoxicidade foram obtidas nos controles das microplacas do teste citotoxicidade dos grupos controle positivo e negativo do experimento, além do grupo comparativo sem secagem (Quadros 25, 26 e 27).

Quadro 25 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do controle positivo do experimento, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1	6	2	5	14	92	98	98	100	97	102
B	2	3	4	3	12	85	95	95	98	95	99
C	3	3	2	4	87	86	96	103	94	89	82

Quadro 26 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do controle negativo do experimento, em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1	2	2	2	41	93	96	91	97	90	100
B	2	2	2	2	41	93	96	91	97	90	100
C	3	3	3	4	76	105	79	91	95	97	98

Quadro 27 - Porcentagens de viabilidade celular obtidas nos grupos controle positivo e negativo das microplacas do teste citotoxicidade do controle comparativo do experimento (sem secagem), em função da concentração dos extratos. São Paulo, 2014.

Placas	Amostras	Controle positivo					Controle negativo				
		100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %	100 %	50 %	25 %	12,50 %	6,25 %
A	1	3	1	46	83	83	84	91	93	91	87
B	2	3	3	4	76	105	79	91	95	97	98
C	3	5	4	4	62	77	71	74	77	70	74

6.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa demonstraram que a utilização de procedimentos operacionais padrão de limpeza validados é essencial para garantir a segurança quanto à citotoxicidade de produtos críticos para saúde e passíveis de reprocessamento, mesmo em condições desafiadoras de sujidade; que puderam ser constatadas na viabilidade celular média apresentada pelo grupo controle positivo do experimento: apenas 2% no extrato a 100%. Esta constatação reforça os achados de Tamashiro *et al.* (2013), que propuseram um protocolo de limpeza para material de cirurgia oftalmológica, cujo método de validação também utilizou cânulas para injeção de solução viscoelástica e baseou-se em ensaios qualitativos de citotoxicidade.

Reconhecidamente a limpeza é o processo fundamental para a garantia da segurança dos produtos para saúde (Alfa *et al.*, 1996, Graziano, 2003); pois remove resíduos químicos, sangue, proteínas, substâncias orgânicas, além de reduzir o número de microrganismos (Ribeiro, 2010). Dentre os métodos de limpeza, a utilização da lavadora ultrassônica para remoção de sujidade aderida às superfícies não friccionáveis tem destaque pelos excelentes resultados na redução da carga orgânica e inorgânica, possivelmente, explicando as altas viabilidades celulares médias encontradas nesta Tese.

O fato pode ser constatado nos achados de Alfa e Nemes (2004), que contaminaram material utilizado em cirurgias minimamente invasivas com ATS (*Artificial Test Soil*), composto por 85,2 mg/mL de proteína, 12,3 mg/mL de carboidratos e 4,12 mg/mL de hemoglobina. Após a lavagem ultrassônica do material (5 minutos de exposição ao detergente e temperatura de 43°C), os resultados obtidos demonstraram uma redução maior que 99% em todos os resíduos orgânicos.

Outro estudo que reforça esta argumentação, é o trabalho de Almeida (2014), que objetivou validar um procedimento operacional padrão para

processamento das vias de irrigação e aspiração de *kits* de facoemulsificação, que são de difícil processamento em razão de sua fabricação em silicone, além de possuírem lúmens de 1 a 2,5 mm e comprimentos de 1,85 a 2,00 m. No referido trabalho, foi realizada a contaminação desafio das amostras com albumina humana 20%, 10^6 UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*, meio de cultura *Tryptic Soy Broth* e solução salina balanceada. Após a aplicação do protocolo proposto, a autora demonstrou redução, entre a ordem de 98,5% e 99,98%, dos resíduos nas amostras por meio da quantificação em RLU de Adenosina Trifosfato (ATP), presença de endotoxinas variando de $< 0,01$ UE/mL a 0,0192 UE/mL (valores aceitos como seguros para o instrumental de oftalmologia), além de não recuperar o microrganismo teste em nenhuma das amostras.

Assim como no trabalho supracitado, na presente pesquisa constatou-se que, mesmo quando o material é submetido à contaminação desafio, o emprego de um procedimento operacional padrão de limpeza validado e baseado nas recomendações da ASCRS e a ASORN (Hellinger *et al.*, 2007), resultou em material atóxico, inclusive tornando indiferente a qualidade da água utilizada no último enxágue. Entretanto, ressalta-se que o enxágue deve ser realizado de forma controlada. A título de exemplo; volumes predeterminados, assim como o tempo de uso de aparatos tecnológicos, como pistolas de água sob pressão. Recomendações vagas e subjetivas, como “enxágue abundante” sem pormenores descritos podem limitar a transposição dos resultados desta Tese a prática assistencial, assim como a não observância das instruções de limpeza adicionais, fornecidas pelos fabricantes dos produtos para saúde (Tamashiro *et al.*, 2013).

Nesta Tese, um dos principais desafios era demonstrar que qualquer efeito citotóxico encontrado seria resultado do enxágue e não dos resíduos da contaminação ou da própria matéria-prima das amostras. Por isso, utilizou-se um procedimento operacional padrão de limpeza, cuja eficácia foi demonstrada pela ausência de efeito citotóxico em cultura de células NCTC clone 929 [Célula L, derivada da linhagem L] (ATCC® CCL-1™) após a contaminação desafio (Tamashiro *et al.*, 2013). Para assegurar a

validade dos resultados, admitiu-se um grupo controle negativo, no qual as amostras foram testadas *in natura*, ou seja, na forma como vieram do fabricante, com o mínimo de manipulação.

O resultado do grupo controle negativo demonstrou viabilidades celulares médias de 90% a 97% (de acordo com a diluição do extrato). Este resultado assegurou afirmar que qualquer toxicidade encontrada seria decorrente do enxágue e não da matéria-prima, uma vez que o alumínio, pode produzir inflamação ocular em coelhos a partir de 20 µg (Calogero *et al.*, 2012).

Em relação ao grupo controle comparativo sem secagem, também não foram observadas amostras citotóxicas, sugerindo que a secagem pode não influenciar na citotoxicidade deste material, pelo menos no tempo de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, período compreendido entre o término da limpeza e a secagem das amostras. A aplicação deste dado a outros materiais com comprimentos maiores ou constituídos de outras matérias-primas, requer validação.

Ao contrário do esperado, foi possível obter a viabilidade celular média de 99% nas amostras que receberam enxágue com água de torneira, a princípio, contradizendo recomendações oficiais da AAMI (2007) e da ANVISA (2012). Entretanto, este resultado não sustenta a utilização desta qualidade de água para o enxágue final, uma vez que sua caracterização físico-química e microbiológica depende de análise no ponto de uso, as amostras eram recém-fabricadas, em ótimo estado de conservação, e o efeito do uso da água de torneira ao longo do tempo não foi objeto de investigação nesta Tese. Isso posto, o fato apenas atenua a gravidade da infração sanitária em caso de descumprimento da RDC ANVISA n. 15 de 2012 (Brasil, 2012), desde que a instituição utilize procedimentos operacionais padrão com eficácia comprovada e atestada na rotina operacional por monitores de limpeza.

A AAMI (2007) evidencia diversos inconvenientes associados à água de torneira, como: má conservação dos produtos para saúde, corrosão, mau funcionamento, obstrução de lúmens, efeitos tóxicos decorrentes de

quantidades elevadas de endotoxinas, comprometimento da eficácia de detergentes e desinfetantes, quando esta não atende às especificações recomendadas.

De forma geral, as principais contraindicações da água de torneira para o enxágue baseiam-se na corrosão do instrumental e na falta de controle dos contaminantes de origem biológica, como endotoxinas e bactérias Gram-negativas. Além disso, há também a problemática da variação sazonal e geográfica dos contaminantes orgânicos e inorgânicos da água (AORN, 2013) e dos biofilmes formados nas tubulações dos sistemas condutores de água, fatos que demandam a adoção de uma rotina de monitoramento constante da qualidade.

Em relação à corrosão do material, faz-se necessário esclarecer que grande parte do orçamento de um Centro Cirúrgico é destinado à aquisição do instrumental cirúrgico, dos quais se destacam aqueles confeccionados em aço inoxidável (Porteus, 2011).

Considerando que o material de aço inoxidável também é sujeito à corrosão, é necessário que receba um tratamento chamado passivação. Durante este processo, o material é imerso em uma solução de ácido nítrico para remoção dos resíduos de aço carbono e para que seja produzida uma camada de óxido de cromo, responsável pela resistência à corrosão (Porteus, 2011). Desta forma, é recomendada a utilização de água submetida ao abrandamento ou deionizada para o enxágue final, visando à redução do depósito de impurezas no instrumental, que pode danificá-lo. Quando a água de torneira for utilizada para o enxágue final, os produtos devem ser secados imediatamente (Porteus, 2011).

Em 1997, um estudo nacional, que teve como objetivo investigar manchas marrons no instrumental cirúrgico, evidenciou diversas alterações nos contaminantes da água utilizada na geração do vapor: alta quantidade de ferro e cloreto, com elevação do pH e da condutividade da água. De acordo com a autora, estas alterações são extremamente prejudiciais ao instrumental: o pH pode favorecer um meio agressivo, quando reduzido, facilita a ação de cloretos na destruição da camada passiva do instrumental;

os metais pesados, como o ferro, agridem a superfície do material de aço inoxidável, provocando corrosão; já a elevação na condutividade da água acelera a corrosão e contribui para manchas e opacidade do instrumental (Fonseca, 1997). Este estudo demonstra a importância do monitoramento e do controle da qualidade da água no CME, conforme estabelecido na RDC ANVISA n. 15 de 2012 (Brasil, 2012), incluindo a água para geração do vapor na autoclave.

Além dos danos ao instrumental, Fonseca (1997) aponta outros problemas relacionados ao instrumental em mau estado de conservação:

- Insegurança e constrangimento da equipe cirúrgica;
- Necessidade de troca do material;
- Aumento do tempo de uso da sala de operação;
- Desperdício de material;
- Diminuição do instrumental durante o período em que está em reparo.

Outro aspecto relevante que deve ser considerado na contraindicação da água de torneira para o enxágue, trata-se da contaminação por endotoxinas. Embora a água de torneira utilizada nesta pesquisa apresentasse 4,70 UE/mL, inferior ao limite de 10 UE/mL da AAMI (2007), é preciso ressaltar que o endotélio ocular é extremamente sensível às endotoxinas. Sakimoto *et al.* (2009) demonstraram por meio da injeção intraocular em coelhos que quantidades de 0,23 a 0,60 UE podem produzir a inflamação do segmento anterior. Já o trabalho de Buchen *et al.* (2012), também realizado por meio da injeção intraocular em coelhos, identificou que as quantidades de 0,02 e 0,08 UE em soluções viscoelásticas e soluções salinas balanceadas, respectivamente, são capazes de causar inflamação. Neste trabalho, os autores propõem que a agência norte-americana *FDA* utilize os achados para especificar limites de endotoxinas para diferentes categorias de produtos de uso oftalmológico.

Considerando que as quantidades de endotoxinas capazes de produzir inflamação são baixas quando comparadas ao limite aceito pela AAMI (2007) na água destinada ao último enxágue, 10 UE/mL, infere-se

que o controle de endotoxinas é necessário para reduzir ao máximo a presença desse contaminante em produtos críticos para saúde.

Outro dado que apoia esta observação, trata-se do estudo de Ribeiro (2006), que identificou 862,30 UE/mL na água de torneira utilizada para a limpeza e enxágue de cateteres de angiografia. Esta contradição nos valores obtidos na presente Tese e os valores encontrados por Ribeiro (2006) sugerem que as quantidades de endotoxinas na água de torneira são altamente variáveis, sugerindo a necessidade da inclusão deste controle na RDC ANVISA n. 15 de 2012 (Brasil, 2012).

O uso de água tratada por deionização no último enxágue apresenta controvérsias. A AAMI (2007) endossa o emprego de água deionizada para todas as etapas do processamento, exceto o enxágue final. Esta recomendação baseia-se no tratamento limitado da água que, neste caso, visa a remover apenas contaminantes inorgânicos, logo, a contaminação microbiológica pode permanecer, como foi observado na caracterização da água utilizada nesta pesquisa - 530 UFC/mL de bactérias heterotróficas, sendo, portanto, indicado um sistema de filtração da água no final do processo de deionização (AAMI, 2007).

Para a AORN (2013), a água submetida a um processo de abrandamento ou deionização pode ser utilizada para o último enxágue. As justificativas para esta afirmação são a remoção mais eficiente de sujidade e resíduos, com a vantagem da remoção de íons cálcio e magnésio, que causam manchas no instrumental. Já a deionização da água apresenta a vantagem adicional de remover sais e íons.

Embora as viabilidades celulares médias encontradas estejam satisfatórias em todas as concentrações dos extratos – variação de 95% a 88%, a falta de controle de microrganismos, carbono orgânico total e endotoxinas ainda contraindica a utilização da água deionizada sem controle microbiológico no enxágue final de produtos críticos para saúde, assim como a água de torneira. O fato é reforçado pelo número de UFC/mL encontrado na água deionizada, 530 UFC/mL, que foi superior ao verificado na água de torneira, 220 UFC/mL – em ambos os casos (não

necessariamente microrganismos Gram-negativos); embora a quantidade de endotoxinas tenha sido o inverso: 1 UE/mL da água deionizada e 4,70 UE/mL na água de torneira; ambas aceitas como seguras pela AAMI (2007).

Por outro lado, a remoção de componentes inorgânicos na deionização torna que esta seja uma opção para realização de pré-limpeza, limpeza e enxágue preliminar do material, além de ser utilizada na alimentação de pasteurizadoras, lavadoras, desinfetadoras e equipamentos de esterilização que empregam vapor, ozônio e óxido de etileno; de acordo com as especificações de cada fabricante (AAMI, 2007).

O uso de água destilada também é um tema controverso, sobretudo quanto à necessidade de sua esterilidade. Há inclusive uma publicação afirmando que *A única forma segura para remover resíduos de detergentes é através de limpeza com utilização de jatos de água estéril*, sem referência a estudos primários (Alves *et al.*, 2013).

Para a ASCRS e a ASORN (Hellinger *et al.*, 2007), quando não especificado pelo fabricante, o enxágue final do instrumental de oftalmologia deve ser realizado com água deionizada ou destilada estéril. Esta observação é sustentada pelo estudo de Tamashiro *et al.* (2013), que demonstrou ausência de citotoxicidade nas amostras processadas e enxaguadas com água destilada estéril.

Na presente pesquisa, a esterilidade da água destilada não demonstrou ser uma condição essencial à ausência de citotoxicidade, uma vez que a viabilidade celular média no grupo experimental foi de 91% nos extratos a 100%. Embora a ASCRS e a ASORN (Hellinger *et al.*, 2007) recomendem água estéril, os resultados sugerem que a toxicidade pode estar relacionada à limpeza deficiente, mas não necessariamente à quantidade de microrganismos e endotoxinas no enxágue final.

Em relação à água tratada por osmose reversa, as viabilidades celulares médias encontradas variaram de 98% a 88%, de acordo com a concentração do extrato, demonstrando segurança para a realização do último enxágue.

Uma consideração importante que deve ser realizada, trata-se das dificuldades relacionadas ao armazenamento da água submetida à osmose reversa ou qualquer tratamento. De forma geral, os reservatórios são considerados pontos críticos dos sistemas de tratamento de água e devem ser construídos com material inerte para evitar a contaminação do conteúdo. Além disso, devem ter características e rugosidade apropriadas para dificultar a aderência de resíduos, a formação de biofilme e a corrosão pelos desinfetantes (Brasil, 2013).

Nesta Tese, tanto a água destilada, como a água de osmose reversa foram armazenadas por não mais de 12 horas em reservatórios fornecidos pelo fabricante dos equipamentos, que foram submetidos a procedimentos de limpeza e desinfecção prévios, conforme orientações recebidas. Mesmo com estes cuidados, foram observadas contagens microbianas na ordem de 10^2 UFC/mL; considerada inadequada para o último enxágue de produtos críticos para saúde, conforme a AAMI (2007).

Ciente da necessidade do controle de qualidade da água, a RDC ANVISA n. 15 de 2012 determina que os CMEs Classe II e as empresas processadoras devem periodicamente realizar o controle da qualidade da água, que inclui a mensuração da dureza da água, pH, íons cloreto, cobre, ferro, manganês e a carga microbiana nos pontos de enxágue de material (Brasil, 2012). Porém, a referida RDC não menciona a importância da implantação de protocolos para limpeza e sanitização de reservatórios de água para enxágue, que são essenciais para o controle da qualidade da água.

O controle microbiológico e físico-químico da água armazenada é necessário e torna-se evidente com o relato de Uetera *et al.* (2013), que após a instalação de um sistema de tratamento e armazenamento de água tratada por osmose reversa visando a atingir o padrão da AAMI (2007) para água de enxágue final, realizaram um estudo longitudinal durante 5 anos, por meio de análises microbiológicas e físico-químicas. Neste estudo, os autores relataram diversos problemas na manutenção dos sistemas: contaminação com decorrente troca do reservatório, instalação de filtros adicionais e lâmpadas de luz ultravioleta, desinfecções periódicas de todo o sistema de

tratamento, decaimento no desempenho dos filtros e falhas na operação do sistema por parte dos colaboradores.

Na presente Tese, a água tratada por osmose reversa apresentou 150 UFC/mL, valor acima do esperado, fato que demandou a revisão do controle microbiológico por meio de uma lâmpada ultravioleta no tanque de armazenamento e implantação de uma rotina de sanitização do tanque com água sanitária na concentração de 4 mL por litro do tanque, conforme orientações do fabricante do equipamento; atualmente, em estudo para se determinar a periodicidade mínima desse procedimento.

A principal dificuldade encontrada na determinação do número de UFC/mL da água tratada por osmose reversa foi garantir que a contaminação não ocorresse no momento em que a água entrasse em contato com a parte externa da torneira, um trajeto aproximado de 7 cm que forma um ângulo de 90 graus, que é de difícil acesso para desinfecção. Portanto, há que se considerar que o número de UFC/mL encontrado na água tratada por osmose reversa não reflita necessariamente o desempenho do sistema, mas uma contaminação no trajeto da água, que também poderia ocorrer em uma bancada de limpeza no CME.

A água ultrapurificada utilizada na presente pesquisa atendeu aos parâmetros microbiológicos da AAMI (2007). Esta água não foi armazenada, sendo colhida e utilizada imediatamente após sua geração. Conforme o esperado, as amostras enxaguadas com esta água demonstraram viabilidade celular média de 100% no extrato não diluído (100%) atestando uma de suas principais aplicações, que é o preparo de meios para a cultura de células.

Uma variável importante na condução desta Tese trata-se das impurezas no vapor utilizado na esterilização das amostras. Hellinger *et al.* (2006) constataram contaminantes inorgânicos, como sulfato, cobre e zinco no vapor das autoclaves. Essas substâncias também podem ser associadas à ocorrência de TASS, pela contaminação do instrumental de oftalmologia durante a esterilização. Nos achados deste estudo, a quantidade de sulfato, cobre e zinco era maior no instrumental retirado de uso, após um surto de TASS do que no instrumental novo, conforme os dados do Quadro 27.

Quadro 28 - Contaminantes identificados no lavado do instrumental, de acordo com o período de utilização.

Contaminantes	Instrumental antigo*	Instrumental novo**
Zinco	0,75 mg/L	0,38 mg/L
Cobre	0,06 mg/L	0,03 mg/L
Sulfato	4,92 mg/L	0 mg/L

*Instrumental recolhido durante o surto de TASS em 2002.

**Instrumental novo, adquirido em 2003.

Fonte: Hellinger *et al.*, 2006.

Neste estudo, uma das hipóteses para a deposição de sulfato, cobre e zinco que resultou em um surto de TASS, trata-se da manutenção inadequada do gerador de vapor da autoclave. Durante 5 anos, o equipamento foi lavado e drenado semanalmente, até que com a terceirização, o serviço passou a ser realizado uma vez a cada 4 a 8 semanas, ocasionando o aumento dos contaminantes na água de geração do vapor.

Na ciência da necessidade de controle dos contaminantes do vapor, a norma ANSI/AAMI/ISO 17665-1, parte 2 (2009) estabelece limites de contaminantes mensurados no condensado do vapor. No referido documento, são considerados tanto contaminantes relacionados à corrosão do instrumental, como a contaminação da carga. Estes contaminantes estão representados nos dados dos Quadros 28 e 29:

Quadro 29 - Contaminantes relacionados à corrosão do instrumental mensurados na entrada de vapor da autoclave.

Contaminante	Valor limite
Silicato (SiO₂)	0,1 mg/L
Ferro	0,1 mg/L
Cádmio	0,005 mg/L
Chumbo	0,05 mg/L
Metais pesados, exceto ferro, cádmio, chumbo	0,1 mg/L
Cloreto (Cl⁻)	0,1 mg/L
Fosfato (P₂O₅)	0,1 mg/L
Condutividade (a 25 °C)	3 µS/cm
pH (grau de acidez)	5 a 7
Aparência	Incolor, límpida, sem sedimento
Dureza (Σ de íons de metais alcalino-terrosos)	0,02 mmol/L

Fonte: ANSI/AAMI/ISO 17665-1 (2009).

Quadro 30 - Contaminantes relacionados à contaminação da carga mensurados no condensado do vapor na câmara.

Contaminante	Valor limite
Acidez ou alcalinidade	R ^a
Amônio (NH ₄)	0,2 mg/L
Cálcio e Magnésio	R ^a (mg/L)
Metais pesados	0,1 mg/L
Cloreto (Cl ⁻)	0,5 mg/L
Nitrato (NO ₃)	0,2 mg/L
Sulfato (SO ₄)	R ^a (mg/L)
Substâncias oxidáveis	R ^a
Resíduo de evaporação	30 mg/L
Silicato (SiO ₂)	0,1 mg/L
Fosfato (P ₂ O ₅)	0,1 mg/L
Condutividade (a 25 °C)	35 µS/cm
Endotoxinas bacterianas	0,25 UE/mL
Aparência	Límpida, incolor

R^a – Teste reagente conforme especificado na Farmacopeia Europeia.

Fonte: ANSI/AAMI/ISO 17665-1 (2009).

No LEM-EE-USP, visando ao controle desta variável na presente Tese, além do controle microbiológico (Martin, Dailey, 2001), optou-se pela lavagem do reservatório da autoclave com detergente enzimático, seguida de enxágue com água tratada por osmose reversa (aproximadamente 32 litros de água; quatro vezes o volume total do reservatório de 8 litros). Para a geração do vapor, utilizou-se água tratada por osmose reversa recém-produzida; de forma a tornar irrelevante a interferência de possíveis contaminantes no vapor. Esta constatação foi possível pela ausência de toxicidade em todos os grupos experimentais, sendo, portanto, estabelecida como rotina. Isso posto, optou-se por não realizar a análise da água do reservatório e da água condensada na câmara do equipamento.

Embora nos resultados da presente pesquisa tenham sugerido ausência de citotoxicidade nas amostras esterilizadas pelo vapor, o mesmo não se aplica a outros métodos. Duffy *et al.* (2000) evidenciaram que o lavado de cânulas de oftalmologia submetidas à esterilização no sistema *AbTox Plazlite*®, no qual ocorre a vaporização do ácido peracético, ácido acético e peróxido de hidrogênio a 40 °C (Smith *et al.*, 2000), produz lesões irreversíveis em contato com o endotélio ocular. Os corpos de prova deste estudo apresentaram quantidades de 7,64 mg/mL de cobre e 5,90 mg/mL de

zinco, contra 0,14 mg/mL e 1,35 mg/mL de cânulas esterilizadas em óxido de etileno.

Na presente pesquisa, a água utilizada para o enxágue das amostras apresentou quantidades de cobre de 0,01 a 0,04 mg/mL, variando em função do tratamento considerado. Em razão das quantidades encontradas, descartou-se a hipótese de que qualquer efeito citotóxico encontrado seria decorrente do cobre presente na água do enxágue, pela mesma razão, não foram realizadas as análises do zinco, pois foram presumidos valores inferiores aos constatados no estudo de *Duffy et al.* (2000).

Embora a AAMI (2007) e a RDC ANVISA n. 15 de 2012 não considerem o zinco no controle dos contaminantes da água, evidências demonstraram a necessidade da inclusão deste metal nas análises, tanto para fins de controle de qualidade da água do enxágue, quanto para validação da segurança de novos métodos de esterilização, considerando as observações peculiares realizadas nas cânulas de oftalmologia esterilizadas no sistema *AbTox Plazlite®* (Duffy *et al.*, 2000).

Contudo, os resultados permitiram afirmar que o enxágue final dos produtos críticos novos para saúde pouco influencia a citotoxicidade quando a limpeza é realizada, observando-se um POP validado.

7.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

As cânulas de hidrodissecção não demonstraram citotoxicidade, independentemente da qualidade de água utilizada no último enxágue, refutando a hipótese inicial desta Tese.

8.

Considerações Finais

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que os resultados desta pesquisa possam ser seguramente incorporados à prática assistencial, o estabelecimento deve atender às definições de CME Classe II, conforme disposto na RDC ANVISA n. 15 de 2012 e aderir às boas práticas relacionadas no *guideline* da ASCRS e ASORN, que são destinadas aos produtos para saúde utilizados em cirurgia oftalmológica.

Os resultados apresentados puderam ser alcançados unicamente por meio da utilização de um procedimento operacional padrão de limpeza, baseado em literatura científica, em recomendações oficiais e na legislação relacionada. Desta forma, os resultados apresentados não se aplicam a serviços que não possuem POPs específicos para o instrumental de cirurgia oftalmológica.

Para que o instrumental seja processado com segurança, é fundamental que cada etapa do POP seja baseada em um referencial científico atualizado, orientações adicionais fornecidas pelo fabricante e legislação relacionada. Para assegurar a constância nos resultados, ressalta-se a necessidade de utilização de monitores de limpeza comercialmente disponíveis, visando à identificação de potenciais falhas mecânicas da lavadora ultrassônica, visto que o diâmetro das amostras utilizadas não permite a limpeza manual do lúmen e a inspeção visual, mesmo com lentes de magnificação, é insuficiente para atestar um instrumental isento de resíduos orgânicos.

Isso posto, a utilização de monitores de qualidade da limpeza, recomendada pela RDC ANVISA n. 15 de 2012 é um dos itens essenciais para garantia da constância de resultados obtidos com os POPs.

Apesar dos resultados terem demonstrado equivalência quanto à qualidade da água para o último enxágue, aspectos relacionados à conservação do instrumental não fizeram parte do escopo da pesquisa,

sendo, portanto, contraindicada a utilização de água de torneira no último enxágue. Além disso, ressalta-se que a variabilidade dos contaminantes na água de torneira é difícil de ser prevista, assim como o número de UFCs em água submetida apenas a deionização.

Todas as exigências contidas na RDC ANVISA n. 15 de 2012 (Brasil, 2012) mereceriam ser categorizadas de acordo com a força das evidências, tal qual acontece com as recomendações dos *guidelines* dos *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* – Quadro 30:

Quadro 31 - Sistema adotado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para categorização das recomendações.

Categoria	Definição
IA	Medida fortemente recomendada para implementação e fortemente apoiada por estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem desenhados.
IB	Medida fortemente recomendada para implementação e apoiada por alguns estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos ou por forte racional teórico.
IC	Medida requerida por legislação estadual ou federal.
II	Medida recomendada para implementação e apoiada por estudos clínicos ou epidemiológicos sugestivos ou por racional teórico.
Sem recomendação	Assunto não resolvido. Prática com evidências insuficientes ou sem consenso sobre a eficácia.

Fonte: Petersen *et al.*, 2011.

Esta categorização certamente direcionaria a fiscalização sanitária em CMEs e as respectivas aplicações de penalidades. Neste contexto, os resultados obtidos nesta Tese, se observados os valores-limite declarados, categorizariam o controle da qualidade da água do enxágue final dos produtos críticos para saúde visando à prevenção de eventos adversos como: IC - Medida requerida por legislação estadual ou federal. Entretanto, é necessário ponderar que o enxágue final está condicionado à limpeza baseada em POPs validados e que os resultados desta Tese limitam-se a materiais novos, o que poderia ser entendido, como “em bom estado de conservação” – fato que está relacionado ao controle de contaminantes da água, conforme disposto nos manuais de conservação que acompanham o instrumental. Entre outras palavras, se o controle de contaminantes não for

necessário por motivos relacionados a eventos adversos, será obrigatório para fins de conservação do instrumental.

Uma vez que a RDC ANVISA n. 15 de 2012, não especifica os valores-limite para contaminantes na água destinada ao último enxágue de produtos críticos para saúde, os valores obtidos na quantificação dos contaminantes da água tratada por destilação, osmose e/ou ultrapurificação podem ser utilizados, como referência para o cumprimento do artigo 74, e os sistemas de tratamento de água utilizados devem atender à realidade específica de cada instituição, de acordo com as características da água de alimentação do sistema; ressaltando que atenção especial deve ser dispensada ao local de armazenamento da água tratada.

Embora não tenha se constituído objetivo desta Tese, sugere-se que em estudos voltados a validação de POPs de limpeza de produtos críticos para saúde, os corpos de prova avaliados quanto à citotoxicidade devem apresentar viabilidade celular mínima de 80%, para que sejam considerados limpos, após contaminação desafio.

Por fim, com a finalidade de subsidiar as práticas nos CMEs, embora a escolha do corpo de prova na presente investigação tenha sido uma cânula de hidrodissecção utilizada em cirurgias oftalmológicas, que tem conformação extremamente complexa, os achados desta Tese – limpeza fundamentada em POP validado, mais importante do que a qualidade da água para o último enxágue - podem ser transpostos para outros instrumentos cirúrgicos de menor complexidade, enquanto validações específicas não evidenciarem novos fatos.

Referências

REFERÊNCIAS

Alfa M. Cleaning: recent advances in products and processes and real-time monitoring. In: Rutala WA. Disinfection, Sterilization and Antisepsis: Principles, practices and new research. Tampa: APIC; 2006. p. 60-71.

Alfa MJ, DeGagne P, Olson N, Puchalski T. Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1996 Feb; 17(2):92-100.

Alfa MJ, Jackson M. A new hydrogen peroxide--based medical-device detergent with germicidal properties: comparison with enzymatic cleaners. *Am J Infect Control.* 2001 Jun;29(3):168-77.

Alfa MJ, Nemes R. Manual versus automated methods for cleaning reusable accessory devices used for minimally invasive surgical procedures. *J Hosp Infect.* 2004; 58(1):50-8.

Almeida AGCS. Validação laboratorial de um procedimento operacional padrão para processamento das vias de irrigação e aspiração do kit de facoemulsificação. [Dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2014.

Alves LFA, Kac MJ, Bisol T, Fernandes BF, Eskenazi DT. Síndrome tóxica do segmento anterior. *Rev bras oftalmol* 2013; 72(1): 29-33.

ANSI/AAMI/ISO 17665-1. Sterilization of health care products — Moist heat — Part 2: Guidance on the application of ANSI/AAMI/ISO 17665-1. 2009.

Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI). Water for the reprocessing of medical devices. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 2007. AAMI Technical information report 34. TIR34:2007.

Association of Perioperative Registered Nurses. Perioperative Standards and Recommended Practices. Denver: AORN; 2013

Azevedo JC, Cruz AS, Pinto TJA. Avaliação da biocompatibilidade de implantes mamários de silicone esterilizados por calor seco e pelo óxido de etileno. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006; 42(2): 259-263.

Bodnar Z, Clouser S, Mamalis N. Toxic anterior segment syndrome: Update on the most common causes. *J Cataract Refract Surg.* 2012; 38(11):1.902-10.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Farmacopeia Brasileira. 5.ed. Volume 2: Monografias. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf (06 jan 2014).

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de qualidade para sistemas de purificação de água para uso farmacêutico. Brasília, 2013. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5619ea004e5c1e4091c9ddd762e8a5ec/guia_purificacao_de_agua.pdf?MOD=AJPERES (19 dez 2013).

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução da diretoria colegiada nº 15, de 15 de março de 2012. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde e dá outras providências. Brasília, 2012.

Breebaart AC, Nuyts RM, Pels E, Edelhauser HF, Verbraak FD. Toxic endothelial cell destruction of the cornea after routine extracapsular cataract surgery. *Arch Ophthalmol*. 1990 Aug; 108(8):1121-5.

Buchen SY, Calogero D, Hilmantel G, Eydelman MB. Rabbit ocular reactivity to bacterial endotoxin contained in aqueous solution and ophthalmic viscosurgical devices. *Ophthalmology* 2012; 119: e4-e10.

Calogero D, Buchen SY, Tarver ME, Hilmantel G, Lucas AD, Eydelman MB. Evaluation of intraocular reactivity to metallic and ethylene oxide contaminants of medical devices in a rabbit model. *Ophthalmology* 2012; 119: e36-42.

Canadian Standards Association (CSA). Decontamination of reusable medical devices. Mississauga, ON: CSA, 2008. Z314.8-08.

Carricas MS; Bellmunt GS; Lasanta LJ; Sanz AI. Toxic Anterior Segment Syndrome (TASS): studying an outbreak. *Fam Hosp*; 32(6): 339-43, 2008 Nov-Dec.

Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Lawrence Erlbaum Associates, 2ª ed. 1988.

Cruz AS. Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

Cutler-Peck CM, Brubaker J, Clouser S, Danford C, Edelhauser HE, Mamalis N. Toxic anterior segment syndrome: common causes. *J Cataract Refract Surg*. 2010 Jul;36(7):1.073-80.

Duffy RE, Brown SE, Caldwell KL, Lubniewski A, Anderson N, Edelhauser H, Holley G, Tess A, Divan H, Helmy M, Arduino M, Jarvis WR. An epidemic of corneal destruction caused by plasma gas sterilization. *Arch Ophthalmol*. 2000 Sep;118(9):1167-76.

Eydelman MB, Tarver ME, Calogero D, Buchen SY, Alexander KY. The Food and Drug Administration's Proactive toxic anterior segment syndrome Program. *Ophthalmology*. 2012 Jul;119(7):1297-302.

Fonseca RMP. Qualidade da água e do vapor interferindo na conservação do instrumental. *Rev SOBECC* 1997; 2(3):20-3.

Gorbet MB, Sefton MV. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*. 2005 Dec; 26(34):6811-7.

Gottsch JD, Schein OD. Taking TASS to task. *Ophthalmology*. 2012 Jul;119(7):1295-6.

Graziano KU. Processos de limpeza, desinfecção e esterilização de artigos odonto-médico-hospitalares e cuidados com o ambiente de centro cirúrgico. In: Lacerda RA, coordenadora. *Controle de infecção em centro cirúrgico: fatos, mitos e controvérsias*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 163-195.

Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, Nalepka JL, Seabold JM. Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants?. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jan 15; 72(1):179-85.

Hellinger WC, Bacalis LP, Edelhauser HF, Mamalis N, Milstein B, Masket S; ASCRS Ad Hoc Task Force on Cleaning and Sterilization of Intraocular Instruments. Recommended practices for cleaning and sterilizing intraocular surgical instruments. *J Cataract Refract Surg*. 2007 Jun; 33(6):1095-100.

Hellinger WC, Hasan SA, Bacalis LP, Thornblom DM, Beckmann SC, Blackmore C, Forster TS, Tirey JF, Ross MJ, Nilson CD, Mamalis N, Crook JE, Bendel RE, Shetty R, Stewart MW, Bolling JP, Edelhauser HF. Outbreak of toxic anterior segment syndrome following cataract surgery associated with impurities in autoclave steam moisture. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 Mar;27(3):294-8.

Holland SP, Mathias RG, Morck DW, Chiu J, Slade SG. Diffuse lamellar keratitis related to endotoxins released from sterilizer reservoir biofilms. *Ophthalmology*. 2000 Jul;107(7):1227-33.

Holland SP, Morck DW, Lee TL. Update on toxic anterior segment syndrome. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007 Feb;18(1):4-8.

Instituto Adolfo Lutz. IAL. Instituto Adolfo Lutz. 2010 [citado 2010 mai. 5]. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/>

International Standard Organization. ISO 10993-5. 2009. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

Johnston J. Toxic anterior segment syndrome--more than sterility meets the eye. *AORN J*. 2006 Dec; 84(6):969-84; quiz 985-6.

Kim JH. Intraocular inflammation of denatured viscoelastic substance in cases of cataract extraction and lens implantation. *J Cataract Refract Surg*. 1987; 13(5):537-42.

Kreisler KR, Martin SS, Young CW, Anderson CW, Mamalis N. Postoperative inflammation following cataract extraction caused by bacterial contamination of the cleaning bath detergent. *J Cataract Refract Surg*. 1992 Jan;18(1):106-10.

Kundsin RB, Walter CW. Detection of endotoxin on sterile catheters used for cardiac catheterization. *J Clin Microbiol*. 1980; 11(3): 209-212.

Leder HA, Goodkin M, Buchen SY, Calogero D, Hilmantel G, Hitchins VM, Eydelman MB. An investigation of enzymatic detergents as a potential cause of toxic anterior segment syndrome. *Ophthalmology*. 2012; 119(7):e30-5.

Lipscomb IP, Sihota AK, Keevil CW. Comparative Study of Surgical Instruments from Sterile-Service Departments for Presence of Residual Gram-Negative Endotoxin and Proteinaceous Deposits. *J Clin Microbiol*. 2006 October; 44(10): 3728-3733.

Maár N, Graebe A, Schild G, Stur M, Amon M. Influence of viscoelastic substances used in cataract surgery on corneal metabolism and endothelial morphology: comparison of Healon and Viscoat. *J Cataract Refract Surg*. 2001 Nov; 27(11):1.756-61.

Mamalis N, Edelhauser HF, Dawson DG, Chew J, LeBoyer RM, Werner L. Toxic anterior segment syndrome. *J Cataract Refract Surg*. 2006 Feb; 32(2):324-33.

Martin MV, Dailey Y. A preliminary investigation of the microbiology and endotoxin content in the water reservoirs of benchtop non-vacuum autoclaves. *Br Dent J*. 2001 Dec 8;191(11):622-4.

Mathys KC, Cohen KL, Bagnell CR. Identification of unknown intraocular material after cataract surgery: evaluation of a potential cause of toxic anterior segment syndrome. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34(3):465-9.

Nuyts RM, Edelhauser HF, Pels E, Breebaart AC. Toxic effects of detergents on the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1990 Aug;108(8):1.158-62.

Parikh C, Sippy BD, Martin DF, Edelhauser HF. Effects of enzymatic sterilization detergents on the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 2002 Feb;120(2):165-72.

Parikh CH, Edelhauser HF. Ocular surgical pharmacology: corneal endothelial safety and toxicity. *Curr Opin Ophthalmol*. 2003 Aug; 14(4):178-85.

Petersen BT, Chennat J, Cohen J, Cotton PB, Greenwald DA, Kowalski TE, Krinsky ML, Park WG, Pike IM, Romagnuolo J; ASGE Quality Assurance in Endoscopy Committee, Rutala WA; Society for Healthcare Epidemiology of America. Multisociety guideline on reprocessing flexible GI endoscopes: 2011. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011; 32(6):527-37.

Pires NR, Cunha PLR, Paula RCM, Feitosa JPA, Jamaru FVF, Filho MOM. Viscoelásticos oftálmicos: comparação entre os comerciais e formulações de galactomanana de *Dimorphandra gardneriana*. 2010; 33(8):1.709-13.

Porteous J. Is stainless steel really "stainless"? *Can Oper Room Nurs J*. 2011; 29(2):26, 28-32.

Ribeiro SMCP. Limpeza. In: Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção relacionada a Assistência a Saúde (APECIH). Limpeza, desinfecção e esterilização de artigos em serviços de saúde. São Paulo: APECIH, 2010. p. 54-82.

Ribeiro SMP. Reprocessamento de cateteres de angiografia cardiovascular após uso clínico e contaminados artificialmente: avaliação da eficácia da limpeza e da esterilização. [Tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2006.

Rutala WA, Weber DJ. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities [online]. Center for Diseases Controle and Prevention. HICPAC; 2008. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf f. (13 jul 2010).

Sakimoto A, Sawa M, Oshida T, Sugaya S, Hirono T, Ishimori A. Minimum endotoxin concentration causing inflammation in the anterior segment of rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53: 425-32.

Santos KA, Cruz EA. Sistemas de geração e distribuição de água purificada na indústria farmacêutica. *Fármacos & Medicamentos*. 2008; 50:34-41.

Smith CA, Khoury JM, Shields SM, Roper GJ, Duffy RE, Edelhauser HF, Lubniewski AJ. Unexpected corneal endothelial cell decompensation after intraocular surgery with instruments sterilized by plasma gas. *Ophthalmology*. 2000 Aug;107(8):1561-6.

Spaulding EH. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block SS. Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger; 1968. p. 517-31.

Spry C. Understanding current steam sterilization recommendations and guidelines. AORN J. 2008 Oct; 88(4):537-50; quiz 551-4.

Stewart BM. The production of high-purity in the clinical laboratory water. Laboratory medicine. 2000; 31(11):605-12.

Tamashiro NS, Souza RQ, Gonçalves CR, Ikeda TI, Luz RA, Cruz AS, Padoveze MC, Graziano KU. Cytotoxicity of cannulas for ophthalmic surgery after cleaning and sterilization: evaluation of the use of enzymatic detergent to remove residual ophthalmic viscosurgical device material. J Cataract Refract Surg. 2013 Jun;39(6):937-41.

Tessarolo F, Caola I, Nollo G, Antolini R, Guarrera GM, Caciagli P. Efficiency in endotoxin removal by a reprocessing protocol for electrophysiology catheters based on hydrogen peroxide plasma sterilization. Int J Hyg Environ Health. 2006; 209(6):557-65.

Uetera Y, Kishii K, Yasuhara H, Kumada N, Moriya K, Saito R, Okazaki M, Misawa Y, Kawamura K. A 5 year longitudinal study of water quality for final rinsing in the single chamber washer-disinfector with a reverse osmosis plant. PDA J Pharm Sci Technol. 2013 Jul-Aug;67(4):399-411.

Vlková H, Babák V, Seydlová R, Pavlík I, Schlegelová J. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms – a review. 2008; Czech J Food Sci, 26:309–323.

Anexo

ANEXO

APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CONSELHO CIENTÍFICO DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

<p>SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS INSTITUTO ADOLFO LUTZ CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL</p>
<p>São Paulo, 21 de novembro de 2012</p>		
<p>Projeto: CTC- 129 D /2012 Análise de citotoxicidade de instrumentos cirurgicos com lúmen após enxágue com diferentes qualidades de água. Coordenação: Dra. Kazuko Uchikawa Graziano (EEUSP) e Dra. Aurea Silveira Cruz (IAL)</p>		
<p>Prezado Coordenador,</p> <p>Comunicamos que o projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL em 21.11.2012. O cadastro final será efetuado após o recebimento de cópia do parecer final do CEPAL ou CEUA, quando pertinente.</p> <p>Cadastrado provisório no CTC-IAL 129 D /2012</p>		
<p>Atenciosamente,</p>
<p>MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY PRESIDENTE DO CTC/IAL</p>		
<p>1ª Via: Coordenador 2ª Via: Diretor de Centro 3ª Via: CTC</p>		