UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo

Fábio Nunes Dias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

D541a Dias, Fábio Nunes
Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo / Fábio Nunes Dias. -- São Paulo, 2007.
120p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vessoni Penna, Thereza Christina

1. Biotecnologia 2. Esterilização : Saúde pública 3. Água : Controle de qualidade 4. Água : Contaminação : Saúde pública
I. T. II. Vessoni Penna, Thereza Christina, orientador.

620.8 CDD

Fábio Nunes Dias

Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque
1º. examinador

Dra. Marina Ishii
2º. examinador

São Paulo, 22 de Agosto de 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Fabio Nunes Dias no Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 22 dias do mês de agosto de 2007, realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Fabio Nunes Dias, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica, intitulada:

"Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Thereza Christina Vessoni Penna	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Marina Ishii	Titular	Externo	Aprovado
Cristina Northfleet de Albuquerque	Titular	FCF - USP	Aprovado
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Jorge Alves de Lima, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 22 dias do mês de agosto de 2007.

Marina Ishii

Cristina Northfleet de Albuquerque

Thereza Christina Vessoni Penna
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 21/08/2007

... Moisés, que havemos de beber? ^()
Então, Deus o instruiu a jogar um lenho
nas águas e elas se tornaram doces.*

Êxodo 15:22–27.

^(*) Indagação dos israelitas a Moisés diante de uma fonte de águas amargas, após andarem três dias no deserto de Sur.

*"No meio de qualquer dificuldade
encontra-se a oportunidade."*

Albert Einstein

*“A verdadeira sabedoria consiste em saber
como aumentar o bem-estar do mundo”.*

Benjamin Franklin

DEDICATÓRIA

À Adriana, minha esposa, com amor e gratidão por sua compreensão e apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. Pelos inúmeros sonos solitários, enquanto velava-me a chama da busca pelo conhecimento. Ladrilhavam o caminho as obras de muitos mestres. Sobre elas, meus pensamentos percorreram em direção ao futuro e à você.

Ao Sr. Antônio e Sra. Helenita, meus pais, senhores de toda minha devoção. Com carinho e gratidão, por terem me mostrado através de suas experiências de vida, a infinita generosidade de Deus e por terem me ensinado a Ele tudo confiar.

À Prof^a. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna, minha orientadora, que além de excelente profissional acadêmico é também um ser humano maravilhoso e que por simples inspiração, forma indivíduos melhores como profissional, cidadão, filho e esposo. Com seu espírito otimista, voa longe, vai à frente, retira as pedras, endireita os caminhos: ensina-nos a crescer!

À Dra. Thereza Christina, meus agradecimentos por tudo o que contribuiu para o meu crescimento científico e intelectual nestes anos de convivência.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Luiz Nogaroto, presidente da Nipro Medical Ltda., pela oportunidade da realização deste estudo, pelo espaço e materiais cedidos, por manter e incentivar o relacionamento entre a universidade e a indústria, como um benefício ao conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, por ter acreditado no meu potencial quando do ingresso neste curso e por toda sua atenção e apoio.

Aos amigos Ivan e Alzira, pela amizade, apoio e confiança. Pela lição aprendida e nunca esquecida.

À Marina, Ângela, Priscila, Irene e a todos os alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Microbiologia Industrial, pela ajuda e amizade.

À Prof^a Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque, pelas valiosas sugestões que somaram-se à finalização deste trabalho.

Ao Anthony, Cláudia, Lúcia, Elisângela, Sônia, Zélia, Dinalva, Wagner, Michaella, Danielly, Cley, Luis, Roberto, Carlos e Zena, Marcos e Ordália, pelo carinho e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Conflitos pela água	4
1.2. Disponibilidade de água	5
1.3. Água e saneamento	7
1.3.1. Ano Internacional do Saneamento	8
1.3.2. Saneamento no Brasil	9
1.4. Dia Mundial da água	10
1.5. Doenças de origem hídrica	11
1.5.1. Escherichia coli	12
1.5.2. Pseudomonas	14
1.5.3. Rotavírus	14
1.6. Biofilmes bacterianos	15
1.7. Fornecimento de água pelo sistema público	16
1.8. Padrões de potabilidade da água para consumo humano	18
1.8.1. Padrão microbiológico	19
1.8.2. Padrão físico-químico	19
1.8.3. Padrão para substâncias químicas de risco à saúde	20
1.8.4. Padrão de radioatividade para água potável	21
1.9. Água para aplicação na área da saúde	21
1.9.1. Água purificada	21
1.9.2. Parâmetros para a água purificada e água para injeção (USP 30)	24
1.9.3. Outras águas destinadas à área da saúde	24
1.10. Aplicação	25
2. OBJETIVO	28
3. DESCRIÇÃO DA INDÚSTRIA	29
3.1. Edwards Lifesciences	29
3.2. Nipro Medical	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Sistema de purificação	31
4.2. Análise microbiológica	33

4.3. Identificação microbiana	35
4.3.1. Sistema BBL™ Crystal™ para identificação rápida de microrganismos	36
4.3.1.1 Sistema para identificação rápida de Gram-positivos	38
4.3.1.2 Sistema para identificação rápida de Gram-negativos	39
4.4. Teste de endotoxinas pelo método gel-clot (LAL)	40
4.5. pH, condutividade e substâncias oxidáveis	41
5. LIMPEZA E DESINFECÇÃO	42
6. RESULTADOS	44
6.1 Contagens heterotróficas	44
6.2. Identificação de microrganismos	60
6.2.1. Gram-negativos	65
6.2.2. Gram-positivos	66
6.3. Endotoxinas	66
6.4. pH, condutividade e substâncias oxidáveis	68
7. DISCUSSÃO	69
8. CONCLUSÃO	72
9. REFERÊNCIAS	73
10. ANEXOS	77
Anexo 1. Coloração de células pelo método de Gram	77
Anexo 2. Oxidase	79
Anexo 3. Indol	80
Anexo 4. Método Gel-clot	81
Anexo 5. Método para substâncias oxidáveis	82
SEGUNDA PARTE	
1. INTRODUÇÃO	84
1.1. Esterilização de artigos médicos	84
1.2. Histórico sobre os oxigenadores de sangue	86
2. OBJETIVO	89
3. MATERIAIS E MÉTODOS	90

3.1. Oxigenadores de sangue e conjuntos de tubos de PVC	90
3.2. Parâmetros do ciclo de esterilização	91
3.3. Carga	93
3.3.1. Oxigenadores	94
3.3.2. Conjuntos de tubos de PVC	94
3.4. Indicadores biológicos	95
3.4.1. Esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i>	95
3.4.2. Proteína verde fluorescente (GFP)	96
3.5. Determinação dos resíduos	96
3.5.1. Cromatógrafo gasoso	96
3.5.2. Extração dos resíduos	97
3.5.3. Curvas padrões	99
3.5.4. Níveis de concentração residual	101
3.6. Limites máximos de resíduos de ETO, EC e EG	102
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.1. Concentração de GFP	105
4.2. Dissipação do gás ETO	107
5. CONCLUSÃO	114
6. REFERÊNCIAS	115
Anexo 01 – Informação para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	117
Anexo 02 – Declaração de Dispensa de Análise do Comitê de Ética em Pesquisa	119

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1. Procedimento de limpeza e sanitização dos estágios do sistema de purificação de água	43
Tabela 2. Contagens heterotróficas ($\log_{10}$ UFC/100mL) dos estágios do sistema de purificação	45
Tabela 3. Reações bioquímicas dos microorganismos Gram-negativos isolados do sistema de purificação de água	63
Tabela 4. Reações bioquímicas dos microorganismos Gram-positivos isolados do sistema de purificação de água	64

SEGUNDA PARTE

Tabela 1. Concentração de GFP remanescente após o processo de esterilização por ETO	106
Tabela 2. Dissipação dos resíduos em oxigenadores Vital™	108
Tabela 3. Dissipação dos resíduos em conjuntos de tubos de PVC	109

LISTA DE QUADROS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1. A Sabesp em números	17
Quadro 2. Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano	19
Quadro 3. Padrão de aceitação da água para consumo humano	19
Quadro 4. Padrão de potabilidade para substâncias químicas de risco à saúde	20
Quadro 5. Padrão de radioatividade para água potável	21
Quadro 6. Parâmetros para a água purificada e água para injeção (USP 30)	24
Quadro 7. Estágios do sistema de purificação de água	31

SEGUNDA PARTE

Quadro 1. Especificação técnica dos oxigenadores	113
---	------------

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1. Manhã de 5/07/1967 – início da Guerra dos Seis Dias	5
Figura 2. Distribuição do consumo da água	6
Figura 3. Distribuição da água no planeta	7
Figura 4. (A) Componentes termoplásticos injetados; (B) Oxigenador Vital™	26
Figura 5. Detalhe dos estágios do sistema de purificação de água	32
Figura 6. Coleta de amostra de água	34
Figura 7. Assentamento de membrana filtrante sobre agar	34
Figura 8. BBL™ Crystal™ - Kit para identificação de microrganismos	35
Figura 9. Tela para introdução do perfil gerado pelo Kit BBL™ Crystal™	37
Figura 10. Tela para visualização da identificação microbiana gerada pelo Kit BBL™ Crystal™	38
Figura 11. Manipulação do Kit BBL™ Crystal™	39
Figura 12. Reposição do filtro 5µm	42
Figura 13. Contagens heterotróficas – dezembro de 2002 e janeiro de 2003	47
Figura 14. Contagens heterotróficas – dezembro de 2003 e janeiro de 2004	49
Figura 15. Contagens heterotróficas – novembro e dezembro de 2004	50
Figura 16. Contagens heterotróficas – janeiro e fevereiro de 2005	51
Figura 17. Contagens heterotróficas – fevereiro/2005	52
Figura 18. Contagens heterotróficas – junho e julho de 2005	53
Figura 19. Contagens heterotróficas – agosto e setembro de 2005	54
Figura 20. Contagens heterotróficas – dezembro de 2005	55
Figura 21. Carga dos filtros de areia	55
Figura 22. Carvão ativado granulado	56
Figura 23. Drenagem dos cilindros	56
Figura 24. Contagens heterotróficas – julho e agosto de 2006	58
Figura 25. Contagens heterotróficas – novembro e dezembro de 2006	59
Figura 26. Contagens heterotróficas – janeiro à dezembro de 2006	60
Figura 27. Microrganismos isolados no sistema de purificação de água	62
Figura 28. (A) – Gram-negativo; (B) – Gram-positivo	78

SEGUNDA PARTE

Figura 1. Oxigenador Vital™	91
Figura 2. Conjunto de tubos de PVC	91
Figura 3. Câmara de esterilização	93
Figura 4. Pálete com carga para esterilização	94
Figura 5. Distribuição dos sensores de temperatura e umidade e indicadores biológicos na carga	95
Figura 6. Extração dos resíduos de ETO, EC e EG	99
Figura 7 – A. Curva de calibração padrão ETO	100
Figura 7 – B. Curva de calibração padrão EC	100
Figura 7 – C. Curva de calibração padrão EG	101
Figura 8. Parâmetros de temperatura, umidade e pressão para ciclo de 2 horas	104
Figura 9. Parâmetros de temperatura, umidade e pressão para ciclo de 4 horas	104
Figura 10. Parâmetros de temperatura, umidade e pressão para ciclo de 8 horas	104
Figura 11. Concentração de GFP remanescente após o processo de esterilização por ETO	107
Figura 12. Dissipação de resíduos de ETO em oxigenadores Vital™	110
Figura 13. Dissipação de resíduos de ETO em Conjuntos de tubos de PVC	111
Figura 14. Dissipação de resíduos de ETO em oxigenadores Oxim-II-34 Ultra	112

DIAS, F. N. **Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo.** [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2007].

RESUMO

A água exerce papel fundamental nas diferentes fases do processo de fabricação de artigos para saúde (médico-hospitalares, farmacêuticos, e clínicos), exigindo elevado grau de pureza, que certifique a sua inocuidade. Portanto, se faz necessário maior controle dos sistemas de purificação de água e suas etapas de tratamento, onde a formação de biofilmes pode contaminar os artigos para saúde e, conseqüentemente, causar injúria a pacientes submetidos à aplicação dos mesmos.

Embora os artigos médicos sejam esterilizados por óxido de etileno (ETO), seu processo de manufatura deve prever o mínimo acréscimo possível de contaminantes.

Considerando que a água purificada e a esterilização dos artigos para saúde são fatores determinantes para o sucesso de sua aplicação, este trabalho foi dividido em duas partes distintas.

A primeira parte aborda o controle das etapas de purificação da água, que é destinada à lavagem de componentes termoplásticos, que são utilizados na fabricação de artigos para saúde.

Os níveis máximos de carga microbiana (expressos em ciclos de $\log_{10}$ UFC/100mL) encontrados ao longo do sistema de purificação de água foram: 3,48 $\log_{10}$ na água de entrada; 3,57 $\log_{10}$ nos filtros multimeios; 3,75 $\log_{10}$ nos abrandadores; 4,97 $\log_{10}$ no filtro de carvão ativado; 2,53 $\log_{10}$ na osmose reversa; 2,70 $\log_{10}$ no tanque de estocagem e distribuição; 2,56 $\log_{10}$ na lâmpada ultravioleta; 2,53 $\log_{10}$ nos filtros 0,05 μ m; 1,98 $\log_{10}$ nos pontos de uso.

Flavimonas oryzihabitans e *Micrococcus luteus* foram as bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, respectivamente, isoladas e identificadas com maior frequência na água, em diferentes estágios do sistema, inclusive após a passagem dessa através das membranas de osmose reversa.

A segunda parte do estudo teve como objetivo determinar o tempo de aeração necessário para que os oxigenadores de sangue e conjuntos de tubos de PVC, após esterilização por ETO, permaneçam em aeração, para dissipação dos resíduos de ETO. Avaliou-se também a potencialidade da proteína verde fluorescente (GFP) como biossensor no processo de esterilização.

O processo de esterilização destes artigos médicos foi monitorado com indicadores biológicos *Bacillus atrophaeus*, proteína verde fluorescente (GFP) e controles de temperatura, pressão e umidade em ciclos de 2 h (ciclo curto), 4 h (meio ciclo) e 8 h (ciclo longo).

As curvas de dissipação, determinadas por cromatografia gasosa, confirmaram níveis residuais menores que 25 ppm para ETO e etileno cloridrina (EC); e inferiores a 250 ppm para etileno glicol (EG), ao final do processo de esterilização para os oxigenadores; e, após 221 horas de aeração, para os conjuntos de tubos de PVC.

Nos ciclos de esterilização, as reduções na intensidade de fluorescência da GFP ocorreram em função do tempo de exposição ao ETO; enquanto germinação de esporos e/ou crescimento de *B. atrophaeus* não foi observado.

PALAVRAS-CHAVE: Água purificada. Osmose reversa. Sanitização. Óxido de etileno. Esterilização de artigos médicos.

DIAS, F. N. **Evaluation of effectiveness of the sanitization of a water purification system. Sterilization of medical devices, residual dissipation of ethylene oxide and the use of green fluorescent protein (GFP) as an indicator of process control.** [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2007].

ABSTRACT

The water exerts important paper in different phases of critical items manufacture in the health care units, pharmaceutical industries, hospitals and clinics, becoming necessary a rigorous control of the water purification systems, storage and distribution, in order to prevent biofilms formation and cross-contamination between devices and patients, who are submitted to critical articles and parenteral solution application. The sterilization of critical devices by ethylene oxide (ETO) should predict minimum addition of possible contaminants and residues.

Considering that the purified water and the sterilization are crucial factors for medical devices, this work was divided in two parts.

The first part evaluated continuously the stages of the system for the purification of the water, which purity level is critical and determines the quality of the washing of thermoplastic components used in the manufacture of critical items.

The maximum levels of heterotrophic load ($\log_{10}$ UFC/100mL) found throughout the water purification system were: 3.48 $\log_{10}$ in the water inlet; 3.57 $\log_{10}$ in the multimedium filters; 3.75 $\log_{10}$ in the softeners; 4.97 $\log_{10}$ in the activated carbon filter; 2.53 $\log_{10}$ in the reverse osmosis; 2.70 $\log_{10}$ in the tank of storage and distribution; 2.56 $\log_{10}$ in the UV lamp; 2.53 $\log_{10}$ in the 0.05 μ m filters; 1.98 $\log_{10}$ in the consumption points.

Flavimonas oryzihabitans and *Micrococcus luteus* were the main Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively found in the purified water after reverse osmosis.

The second part of this study had as objective the determination of the needed aeration time for blood oxygenators and sets of PVC tubing must be kept in aeration room for dissipation of ETO residues; and also evaluated the possibility of GFP as biosensor.

ETO is used as in a mixture (10% ETO and 90% CO₂). Residual levels of ETO and its derivatives, ethylene chloridrin (ECH) and ethylene glycol (EG), which remain in these devices, must be controlled to prevent serious injuries to the patients.

The sterilization process of the oxygenators and sets of PVC tubing was monitored with *Bacillus atrophaeus* and fluorescent green protein (GFP). The temperature, pressure and humidity were controlled in the sterilization cycles of 2 h (short cycle), 4 h (half cycle) and 8 h (long cycle).

The dissipation curves of the residues were determined by gaseous chromatography and the residual concentrations were lower than 25 ppm of ETO and ECH and lower than 250 ppm of EG immediately after the sterilization processes for oxygenators and after 221 hours of aeration for the sets of PVC tubing. Reductions in the fluorescence intensity of GFP were observed as a function of the exposition time to the ETO. No growth of *B. atrophaeus* spores was observed after cycles.

KEYWORDS: Purified water. Reverse osmosis. Sanitization. Ethylene oxide. Medical devices sterilization.

PRIMEIRA PARTE

Avaliação de eficácia da sanitização de um
sistema de purificação de água

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Conflitos pela água*

A história antiga é marcada por guerras provocadas pela invasão dos países com água pelos que ficaram sem ela. Esse foi um dos motivos das seculares invasões dos países da região da Mesopotâmia pelos povos de deserto.

O controle do rio Eufrates foi a base do poder da Primeira Dinastia da Babilônia, possibilitando ao Rei Hamurábi a unificar a Mesopotâmia, elevando a região norte à uma posição hegemônica (MACÊDO, 2004).

A Guerra dos Seis Dias em 1967, teve a sua origem numa disputa sobre água, em que se pretendia desviar o curso do Rio Jordão, a principal fonte de água potável para Israel.

Anos de desentendimento e confrontos culminaram numa guerra de exclusão de partes, em que Israel quadruplicou o território que controlava e ganhou controle completo do dobro dos recursos de água potável (ASSER, 2007).

Os israelenses, com o auxílio dos EUA, atacaram de surpresa o Egito, a Síria e a Jordânia, que preparavam uma ofensiva conjunta contra Israel (Figura 1). O conflito durou menos de uma semana e mudou o mapa geopolítico do Oriente Médio.

Israel anexou ao seu território, em 130 horas de combate, a Península do Sinai e a Faixa de Gaza do Egito; a Cisjordânia e a parte oriental (árabe) de Jerusalém (administradas pela Jordânia); e as Colinas de Golan, da Síria (SCHUL e SPIEGEL, 2007).

Outros exemplos de conflitos, onde a água tem sido motivo de disputas são: Índia e Paquistão, que compartilham bacias hidrográficas; os rios Níger e Nilo, na

África, que possui parte do seu território desértico; Estados Unidos da América e México, devido à construção de barragens pelos EUA no rio Colorado, que deixam pouca água para o México (DIAS *et al.*, 2006).

Figura 1. Manhã de 5/07/1967 – início da Guerra dos Seis Dias. Fonte: www.unificado.com.br

1.2. Disponibilidade da água

A água é um dos recursos naturais fundamentais para a vida e para as diferentes atividades humanas. A sua abundância no planeta causa a falsa sensação de inesgotabilidade. Inúmeras são as previsões relativas à escassez de água, em consequência da desconsideração da sua esgotabilidade. Segundo a FAO, agência das Nações Unidas para agricultura e alimentação, sediada em Roma, o consumo de água dobrou em relação ao crescimento populacional no último século e dentro de 20 anos, uma proporção de dois terços da população do mundo deve enfrentar escassez de água (FAO, 2007).

A irrigação para cultivos agrícolas atualmente responde por 46% de toda a água retirada de lagos, rios e reservatórios subterrâneos (Figura 2).

Figura 2. Distribuição do consumo da água. Fonte: O Estado de São Paulo, 22 de março de 2007.

Em várias partes do mundo, agricultores que tentam produzir alimentos suficientes e obter renda, também enfrentam estiagens sistemáticas e crescente competição por água.

A água propicia saúde, conforto e riqueza ao homem, por meio de seus incontáveis usos, dos quais se destacam o abastecimento das populações, a irrigação, a produção de energia, o lazer e a navegação. A crise da falta de água leva a humanidade a refletir sobre esta problemática em benefício próprio e das gerações futuras.

Setenta e um por cento da superfície da crosta terrestre são cobertos por água. O restante projeta-se acima do nível do mar, formando os continentes e as ilhas.

De toda a água do planeta, 97,5% é salgada, sendo imprópria para consumo humano. Os 2,5% restantes são de água doce (Figura 3), que estão distribuídos na

forma de geleiras e calotas polares, no subsolo, em lagos, rios e pântanos e na atmosfera (O Estado de São Paulo, 2007).

Figura 3. Distribuição da água no planeta.

O Brasil é um país privilegiado, pois aqui estão 11,6% de toda a água doce do planeta. Porém, 80% desta água estão na Amazônia, onde vivem apenas 5% da população brasileira. Lá se encontra o maior rio do mundo em volume de água, o Amazonas. Já o nordeste, por exemplo, possui quase um terço da população e dispõe apenas de 3,3% de toda água do país (MACÊDO, 2004).

1.3. Água e saneamento

Em todo o mundo, cerca de 1 bilhão de pessoas não têm acesso a fontes seguras de água para consumo e sobrevivência e 2,4 bilhões de pessoas não têm acesso a nenhum tipo de saneamento.

Fornecer acesso a quantidades suficientes da água potável, destinação sanitária das excretas e a promoção de comportamentos de saúde e higiene, são de

suma importância para reduzir o crescimento de doenças causadas por estes fatores de risco (OMS, 2007).

O principal benefício dos programas de abastecimento de água e esgotamento sanitário se refere à redução da morbimortalidade de uma série de infecções.

A peste que assolara a cidade de Milão, levou Leonardo da Vinci a ocupar-se em solucionar problemas urbanísticos. Por volta de 1486 ao estilo renascentista, elaborou a planta “da cidade ideal” (*la ideale città*), que seria erguida ao lado de um grande rio, para assegurar o transporte de mercadorias e facilitar a higiene do lugar (Museo Scienza, 2007).

As diarreias bacterianas, a cólera epidêmica e a febre tifóide, transmitidas principalmente pela ingestão de água contaminada, são mais efetivamente prevenidas através de medidas que assegurem a qualidade da água.

O mesmo não ocorre para outros tipos de diarreia (vírus e protozoários), poliomielite, hepatite A, infecções cutâneas e oculares, onde as intervenções mais eficazes se relacionam com a melhoria da higiene pessoal e doméstica, que pode ser estimulada com uma disponibilidade suficiente de água e programas de educação sanitária.

1.3.1. Ano Internacional do Saneamento

A Organização das Nações Unidas (ONU) está preocupada com o progresso lento e insuficiente em proporcionar serviços básicos de saneamento e consciente do impacto da sua falta na saúde das pessoas, na redução da pobreza e no desenvolvimento econômico e social e no meio ambiente, em particular nos recursos

hídricos. Diante deste quadro, declarou que 2008 será o Ano Internacional do Saneamento, com ênfase para a necessidade de implantação de serviço de esgoto sanitário (ONU, 2007).

O saneamento é um problema timidamente discutido pelas populações e a destinação das excretas humanas são assuntos ainda impopulares.

Aproximadamente dois milhões de pessoas morrem a cada ano devido às doenças diarreicas. A maioria delas são crianças com menos de cinco anos de idade. Os mais afetados são as populações dos países subdesenvolvidos, que vivem em condições extremas da pobreza, moradores de periferias ou habitantes rurais.

Entre os problemas principais que são responsáveis para esta situação estão a falta de prioridade dada ao setor do saneamento, a falta de recursos financeiros e comportamentos insuficientes de higiene.

O Ano Internacional do Saneamento foi criado pela Organização das Nações Unidas em dezembro de 2006 para ajudar a acelerar o progresso no saneamento, pondo uma luz sobre esta crise silenciosa.

1.3.2. Saneamento no Brasil

O abastecimento de água constitui questão fundamental e demanda solução, em razão dos riscos que a ausência ou o fornecimento inadequado de água representam para a saúde pública, mas o esgotamento sanitário também representa um grande problema. Enquanto a rede de água e os serviços de coleta de lixo e limpeza urbana se encontram na maioria dos municípios brasileiros, a rede de

esgotamento sanitário está espacialmente concentrada na região Sudeste e nas áreas mais urbanizadas das demais regiões do país.

A hepatite A e a febre tifóide, assim como a maioria das diarreias, são doenças adquiridas pelo consumo de água contaminada por dejetos, e estão relacionadas, portanto, com o esgotamento sanitário, a distribuição e o tratamento de água de abastecimento.

Há doenças relacionadas com o esgotamento sanitário, mas também com as enchentes e o sistema de coleta e destino do lixo, como é o caso da leptospirose, transmitida principalmente pelo contato com a água contaminada pela urina de ratos.

Investigando-se as internações motivadas por um grupo de doenças – agrupadas pela FIOCRUZ – relacionadas à falta de saneamento, como diarreias, hepatite A, febres entéricas e dengue, verifica-se que, no Brasil, em 1993 ocorreram 730 internações por cem mil habitantes, enquanto em 2002, houve 375 internações. Rondônia (1.200) e Piauí (1.198) tinham, em 2002, a pior situação, enquanto São Paulo (105) e Distrito Federal (120) tinham os melhores quadros gerais (IBGE, 2004).

1.4. Dia Mundial da Água

A Organização das Nações Unidas, através da resolução A/RES/47/193, de 22 de dezembro de 1992, declarou o dia 22 de março de cada ano como o Dia Mundial da Água. Este dia tem sido marcado, desde 1993, com várias iniciativas nacionais e internacionais com o intuito de sensibilizar o público em geral para a necessidade de conservar os recursos hídricos e para algumas questões em particular, também relacionadas com a água.

O Dia Mundial da Água deste ano (Folha de São Paulo, 2007) teve como tema a escassez. Segundo informações da Agência Nacional de Águas (ANA), pesquisas recentes apontam que, se mantidas as tendências atuais, mais de 45% da população mundial não poderá contar com a quantidade mínima de água para o consumo diário em 2050.

A cada ano, uma agência diferente da ONU produz um kit sobre o tema e distribui nas redes de agências contatadas ao redor do planeta. O trabalho tem como objetivos abordar vários assuntos relacionados à água: problemas de abastecimento de água potável; aumentar a consciência pública sobre a importância de conservação, preservação e proteção da água; aumentar a consciência dos governos, agências internacionais, organizações não-governamentais e setor privado; estimular a participação e cooperação da população civil.

1.5. Doenças de origem hídrica

A qualidade da água, por si só (em particular a qualidade microbiológica da água), tem uma grande influência sobre a saúde. Se não for adequada, pode ocasionar surtos de doenças e causar sérias epidemias. Os riscos à saúde, associados à água, podem ser de curto prazo, quando resultam da poluição de água causada por elementos microbiológicos ou químicos, ou de médio e longo prazo (quando resultam do consumo regular e contínuo, durante meses ou anos, de água contaminada com produtos químicos, como certos metais ou pesticidas).

A água serve de veículo para a transmissão de uma variedade de doenças causadas por microrganismos, resultantes da ingestão de água contaminada ou emprego de água poluída para irrigação, pesca e recreação.

Os dejetos provenientes do homem e de animais representam a principal fonte de contaminação da água. Assim, o tratamento da água para consumo humano é importantíssimo na prevenção de doenças.

Os métodos microbiológicos têm sido largamente empregados na monitoração da contaminação fecal e determinação da presença de microrganismos patogênicos na água.

Vários tipos de microrganismos patogênicos podem ser encontrados na água. A patogenicidade dos microrganismos depende de fatores como a capacidade de produção de toxinas e a resistência do hospedeiro. Qualquer microrganismo é patogênico em potencial, caso encontre um hospedeiro debilitado. Os principais gêneros patogênicos são: *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (MACÊDO, 2004).

1.5.1. *Escherichia coli*

Os coliformes fecais têm como principal representante a espécie *Escherichia coli*, parte da flora intestinal normal do homem e de uma variedade de mamíferos, são importantes indicadores de contaminação fecal na água. Esta espécie compreende os seguintes grupos:

- *E. coli* enteropatogênica é responsável por surtos de diarreias infantis e infecções hospitalares. Este microrganismo produz citotoxinas que

agem sobre as células das vilosidades causando atrofia e destruição celular, levando à desidratação.

- *E. coli* enteroinvasora provoca infecção intestinal em crianças com mais de dois anos e em adultos. Invade e destrói o epitélio do cólon por meio de toxinas, desenvolvendo um processo inflamatório que diminui a absorção de água e nutrientes, caracterizando um quadro disentérico.
- *E. coli* enterotoxigênica é responsável pela chamada “diarréia do viajante”, que atinge crianças e adultos. Produz enterotoxinas que provocam diarréia aquosa e por não penetrarem no epitélio intestinal, não aparecem nas fezes muco, sangue ou leucócitos.
- *E. coli* enterohemorrágica produz citotoxinas que provocam a diarréia sanguinolenta, caracterizando a doença chamada colite hemorrágica.

A diarréia pode durar alguns dias, ou diversas semanas, como é o caso da diarréia persistente.

A diarréia ocorre no mundo todo e causa 4% de todas as mortes. É responsável por infecções gastrintestinais que matam ao redor de 2.2 milhões de pessoas mundialmente todos os anos, a maioria crianças.

A água contaminada é a principal causa da diarréia e o uso da água limpa na higiene é uma importante medida de prevenção (WHO, 2007).

1.5.2. *Pseudomonas*

Também merecem atenção as bactérias capazes de induzir infecções externas no corpo, quando o risco decorre do simples contato com a água contaminada, mesmo sem ingestão. Um exemplo comum é a *Pseudomonas aeruginosa*, que está amplamente distribuída na natureza (solo, água e alimentos) e no homem, podendo causar doenças em indivíduos debilitados. As manifestações clínicas variam de meningite, infecções de ferimentos, ouvidos, olhos e do trato urinário até sepsis com necrose hemorrágica de pele.

Pseudomonas aeruginosa permanece como um dos mais prevalentes agentes de infecções hospitalares em todo o mundo. Apesar dos avanços tecnológicos em relação ao desenvolvimento de fármacos de maior potência antibacteriana, suas características naturais de resistência a mantém em papel de destaque referente às dificuldades terapêuticas (ARRUDA, 1998).

Outro dado preocupante tem sido o fato da presença de *Pseudomonas aeruginosa* em garrações de água mineral. Dados revelam o alto número de garrações contaminados por esta bactéria, principalmente devido à falta de cuidado no transporte e armazenamento dos garrações vazios, aliados à falta de higienização adequada destes recipientes nas empresas engarrafadoras (MACÊDO, 2004).

1.5.3. Rotavírus

Outro agente preocupante é o Rotavírus que tem sido considerado, em todo o mundo, o principal responsável por diarreia em crianças menores de cinco anos e tem sido a principal causa de surtos de diarreia nosocomiais e em creches ou pré-escolas. Praticamente todas as crianças se infectam nos primeiros anos de vida,

porém, os casos graves ocorrem principalmente em crianças até dois anos de idade, sendo que, crianças prematuras, de baixo nível sócio-econômico ou com deficiência imunológica estão mais sujeitas a desenvolver um quadro mais grave da doença.

Em adultos, é mais rara, tendo sido registrados surtos em espaços fechados como escolas, ambientes de trabalho ou em hospitais.

A infecção causada pelo Rotavírus varia de um quadro leve, com diarreia líquida e duração limitada a quadros graves com desidratação, febre e vômitos, podendo ocorrer também casos assintomáticos.

Os Rotavírus, eliminados em alta quantidade nas fezes de crianças infectadas, são transmitidos pela via fecal-oral, por água ou alimentos, por contato pessoa-a-pessoa, objetos contaminados e, provavelmente, também por secreções respiratórias, mecanismos que permitem uma alta capacidade de alastramento dessa doença (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2003).

1.6. *Biofilmes bacterianos*

Os biofilmes também devem ser considerados de extrema importância na transmissão de microrganismos, sendo a fonte da maioria das bactérias livres, flutuantes encontradas na água (MACÊDO, 2004). Muitas destas bactérias podem causar doenças.

Os biofilmes bacterianos são um conjunto de microrganismos rodeados por uma substância que eles mesmos secretam (glicocálix), que os adere à uma superfície e ajuda-os a se protegerem contra a maioria dos agentes antimicrobianos.

Diferentes microrganismos vivem em um biofilme e ajudam-se mutuamente. Os restos celulares de uma espécie podem servir de alimento para outra e, utilizando seus recursos bioquímicos, constroem uma colônia comum.

Um biofilme inicia-se com a adesão de uma bactéria pioneira e pode desenvolver-se e elevar-se sobre a superfície interna dos equipamentos e tubulações de um sistema de tratamento de água. Ao atingir um nível de maior turbulência do fluxo de água, poderá desprender fragmentos que contaminarão todo o sistema com bactérias e matéria orgânica e servirá ainda como base para novas formações de biofilmes.

O desenvolvimento de um biofilme maduro pode durar de algumas horas a semanas, dependendo do tipo do sistema, fluxo e temperatura. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria pioneira comum.

1.7. Fornecimento de água pelo sistema público

A Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP, possui um patrimônio líquido de US\$ 4 bilhões e emprega aproximadamente 18 mil colaboradores. Produz 100 mil litros de água por segundo para abastecer uma população correspondente a 60% do total do Estado de São Paulo (SABESP, 2007).

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - Sabesp	
Dados Gerais	
População Total Atendida	25 milhões de pessoas
Municípios Atendidos	367
Índice de tratamento de água	100%
Índice de esgotos coletados	78%
Índice de esgotos tratados	62%
Água	
Produção de Água Tratada	1.574,6 milhões de m³
Ligações cadastradas de água	6,5 milhões
Estações de Tratamento de água	200
Reservatórios	2.037
Capacidade dos reservatórios	2,7 bilhões de litros
Poços	1.073
Adutoras	4.523 quilômetros
Redes de distribuição de água	54.957 quilômetros
Centrais de Controle Sanitário	15
Esgoto	
Estações de tratamento de esgotos	441
Capacidade de tratamento de esgotos	38,1 mil litros/segundo
Redes coletoras de esgotos	37.173 quilômetros
Coletores, emissários e interceptores	1.682 quilômetros
Ligações cadastradas de esgotos	4,9 milhões

Quadro 1. A Sabesp em números. Fonte: www.sabesp.com.br

Uma das principais fontes de captação de água na região metropolitana de São Paulo é a Bacia do Guarapiranga, que sofre com a ocupação desordenada e irregular.

O avanço populacional desordenado traz problemas crescentes e compromete a qualidade da água. Florações de algas originadas pelo aumento de cargas poluidoras em seu leito são frequentemente registradas.

Toda água fornecida à população é tratada, através de processo convencional, com a finalidade de reduzir as impurezas até os níveis de potabilidade.

O processo realizado pela Sabesp é o convencional e consiste nas seguintes etapas:

Pré-cloração: Adição de cloro assim que a água chega à estação para facilitar a retirada de matéria orgânica e metais.

Pré-alkalinização: Adição de cal ou soda à água para ajustar o pH aos valores exigidos para as fases seguintes do tratamento.

Coagulação: Adição de sulfato de alumínio, cloreto férrico ou outro coagulante, seguido de uma agitação violenta da água para provocar a desestabilização elétrica das partículas de sujeira, facilitando sua agregação.

Floculação: Mistura lenta da água para provocar a formação de flocos com as partículas.

Decantação: Passagem da água por grandes tanques para decantar os flocos de sujeira formados na floculação.

Filtração: Passagem da água por tanques que contêm leito de pedras, areia e carvão antracito para reter a sujeira que restou da fase de decantação.

Pós-alkalinização: Correção final do pH da água para evitar problemas de corrosão ou incrustação das tubulações.

Desinfecção: Adição de cloro à água antes de sua saída da Estação de Tratamento para manter um teor residual, até a chegada na casa do consumidor, e garantir que a água fornecida atenda aos limites estabelecidos.

Fluoretação: Adição de flúor à água para a prevenção de cáries.

1.8. Padrões de potabilidade da água para consumo humano

A água doce da natureza, presente nos rios, lagos e lençóis subterrâneos, contém substâncias como sais dissolvidos, partículas em suspensão e microrganismos que podem gerar contaminação e danos à saúde. Portanto, a água potável deve estar em conformidade com o padrão de potabilidade da água para consumo humano (Portaria 518/Ministério da Saúde/Brasil).

A desinfecção da água com cloro é uma das técnicas mais antigas de tratamento. Desde que passou a ser utilizada houve queda no índice de mortalidade infantil e redução das doenças provocadas pela água contaminada.

1.8.1. Padrão microbiológico

PARÂMETRO	VMP ⁽¹⁾
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽²⁾	Ausência em 100mL

Quadro 2. Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano.

Notas: ⁽¹⁾ Valor Máximo Permitido; ⁽²⁾ A detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

1.8.2. Padrão físico-químico

PARÂMETRO	UNIDADE	VMP ⁽¹⁾
Alumínio	mg/L	0,2
Amônia (como NH ₃)	mg/L	1,5
Cloreto	mg/L	250
Cor Aparente	uH ⁽²⁾	15
Dureza	mg/L	500
Etilbenzeno	mg/L	0,2
Ferro	mg/L	0,3
Manganês	mg/L	0,1
Monoclorobenzeno	mg/L	0,12
Odor	-	Não objetável ⁽³⁾
Gosto	-	Não objetável ⁽³⁾
Sódio	mg/L	200
Sólidos dissolvidos totais	mg/L	1.000
Sulfato	mg/L	250
Sulfeto de hidrogênio	mg/L	0,05
Surfactantes	mg/L	0,5
Tolueno	mg/L	0,17
Turbidez	UT ⁽⁴⁾	5
Zinco	mg/L	5
Xileno	mg/L	0,3

Quadro 3. Padrão de aceitação da água para consumo humano.

Notas: ⁽¹⁾ Valor máximo permitido; ⁽²⁾ Unidade Hazen (mg Pt-Co/L); ⁽³⁾ Critério de referência; ⁽⁴⁾ Unidade de turbidez.

1.8.3. Padrão para substâncias químicas de risco à saúde

PARÂMETRO	UNIDADE	VMP(1)
INORGÂNICAS		
Antimônio	mg/L	0,005
Arsênio	mg/L	0,01
Bário	mg/L	0,7
Cádmio	mg/L	0,005
Cianeto	mg/L	0,07
Chumbo	mg/L	0,01
Cobre	mg/L	2
Cromo	mg/L	0,05
Fluoreto ⁽²⁾	mg/L	1,5
Mercúrio	mg/L	0,001
Nitrato	mg/L	10
Nitrito (como N)	mg/L	1
Selênio	mg/L	0,01
ORGÂNICAS		
Acrilamida	µg/L	0,5
Benzeno	µg/L	5
Benzo[a]pireno	µg/L	0,7
Cloreto de Vinila	µg/L	5
1,2 Dicloroetano	µg/L	10
1,1 Dicloroetano	µg/L	30
Diclorometano	µg/L	20
Estireno	µg/L	20
Tetracloreto de Carbono	µg/L	2
Tetracloroetano	µg/L	40
Triclorobenzenos	µg/L	20
Tricloroetano	µg/L	70
Alaclor	µg/L	20
Aldrin e Dieldrin	µg/L	0,03
Atrazina	µg/L	2
Bentazona	µg/L	300
Clordano (isômeros)	µg/L	0,2
2,4 D	µg/L	30
DDT (isômeros)	µg/L	2
Endossulfan	µg/L	20
Endrin	µg/L	0,6
Glifosato	µg/L	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	µg/L	0,03
Hexaclorobenzeno	µg/L	1
Lindano (γ-BHC)	µg/L	2
Metolacloro	µg/L	10
Metoxicloro	µg/L	20
Molinato	µg/L	6
Pendimetalina	µg/L	20
Pentaclorofenol	µg/L	9
Permetrina	µg/L	20
Propanil	µg/L	20
Simazina	µg/L	2
Trifluralina	µg/L	20

Quadro 4. Padrão de potabilidade para substâncias químicas de risco à saúde.

PARÂMETRO	UNIDADE	VMP(1)
CIANOTOXINAS		
Microcistinas ⁽³⁾	µg/L	1
DESINFETANTES E PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA DESINFECÇÃO		
Bromato	mg/L	0,025
Clorito	mg/L	0,2
Cloro livre ⁽⁴⁾	mg/L	5
Monocloramina	mg/L	3
2,4,6 Triclorofenol	mg/L	0,2
Trihalometanos Total	mg/L	0,1

Quadro 4 (Continuação). Padrão de potabilidade para substâncias químicas de risco à saúde.

Notas: ⁽¹⁾ Valor Máximo Permitido; ⁽²⁾ Os valores recomendados para a concentração de íon fluoreto devem observar à legislação específica vigente relativa à fluoretação da água, em qualquer caso devendo ser respeitado o VMP desta tabela; ⁽³⁾ É aceitável a concentração de até 10 µg/L de microcistinas em até 3 (três) amostras, consecutivas ou não, nas análises realizadas nos últimos 12 (doze) meses; ⁽⁴⁾ Análise exigida de acordo com o desinfetante utilizado.

1.8.4. Padrão de radioatividade para água potável

PARÂMETRO	UNIDADE	VMP ⁽¹⁾
Radioatividade alfa global	BQ/L	0,1 ⁽²⁾
Radioatividade beta global	BQ/L	1,0 ⁽²⁾

Quadro 5. Padrão de radioatividade para água potável.

Notas: ⁽¹⁾ Valor máximo permitido; ⁽²⁾ Se os valores encontrados forem superiores aos VMP, deverá ser feita a identificação dos radionuclídeos presentes e a medida das concentrações respectivas. Nesses casos, deverão ser aplicados, para os radionuclídeos encontrados, os valores estabelecidos pela legislação pertinente da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN, para se concluir sobre a potabilidade da água.

1.9. Água para aplicação na área da saúde

1.9.1. Água purificada

A água purificada é utilizada como excipiente na produção de preparações comerciais, aplicações farmacêuticas, limpeza de dispositivos semi-críticos, áreas e equipamentos, assim como na preparação de produtos químico-farmacêuticos e meios bacteriológicos (PENNA *et al.*, 2002).

A água purificada também deve ser usada para todos os testes onde o uso de água é indicado e deve obedecer as exigências para a pureza química e orgânica e deve ser protegida da contaminação microbiana.

A qualidade mínima da água de alimentação do sistema para a produção da água purificada é a água potável (USP 30, 2007).

A água purificada para finalidades industriais, especialmente para a manufatura de dispositivos médico-hospitalares e preparação de soluções parenterais, requer rigor no controle de sistemas de purificação, armazenamento e distribuição, para minimizar a formação do biofilmes resistentes aos procedimentos de sanitização, que acumulam e liberam bactérias e endotoxinas. Estes podem espalhar na água durante o processo de purificação (PENNA *et al.*, 2001), contaminando os dispositivos médicos que, conseqüentemente, transformam-se em um fator de risco potencial para os pacientes que submetidos a procedimentos invasivos ou administrações parenterais (DIAS *et al.*, 2006).

Em lactários, a água foi identificada como o veículo de contaminação na reconstituição do leite em pó usado em formulações lactárias de base terapêutica e nutritiva para crianças hospitalizadas. A água para preparar estas formulações foi positiva em 33.3% para o grupo de coliformes totais e 16.6% para o grupo de coliformes fecais (SALLES e GOULART, 1997).

A contaminação bacteriana de soluções de diálise tem sido relatada (PÉREZ-GARCÍA e RODRIGUEZ-BENÍTEZ, 2000; HOENICH *et al.*, 2006; VORBECK-MEISTER *et al.*, 1999) como um problema de saúde pública. A causa pode ser a água usada nas preparações de soluções, principalmente no ambiente hospitalar.

O papel da contaminação bacteriana da água de diálise com respeito às doenças inflamatórias crônicas associadas à terapia de hemodiálise é

menosprezado (LONNEMANN, 2000). Não obstante, as substâncias pirogênicas de origem bacteriana derivaram dos líquidos contaminados da diálise com a conseqüente indução a uma resposta inflamatória nos pacientes renais.

Os hospitais têm a obrigação de controlar a qualidade microbiológica da água usada para as preparações de diálise e evitar a contaminação bacteriana e a disseminação patogênica.

Conseqüentemente, a sanitização periódica de todas as etapas do sistema de purificação de água deve ser executada para manter o nível de qualidade da água.

A água potável, quando usada em formulações farmacêuticas, deve ser purificada, de acordo com as exigências requeridas para a água purificada, água para a injeção ou água estéril (MACÊDO, 2004).

Para produzir água de acordo com os padrões de segurança estabelecidos para aplicações na saúde, os sistemas de purificação de água mais utilizados em hospitais, indústrias farmacêuticas e de produtos hospitalares, são aqueles que dispõem da integração operacional de equipamentos com leitos de filtração e deionização, projetados para remover material particulado, microrganismos, pirogênios e componentes de carbono orgânico.

A osmose reversa é descrita pela Farmacopéia Americana (USP30, 2007) como uma das operações usadas para produzir a água purificada. Os sistemas equipados com a osmose reversa requerem pré-tratamento da água que alimenta o sistema, gerando custos significativos de operação e manutenção. Não obstante, estes procedimentos são imperativos para garantir a eficácia do sistema em remover elementos orgânicos de baixo peso molecular (OZAKI e LI, 2002), incluindo partículas, pirogênios e microrganismos.

Conseqüentemente, os pontos de amostragem da água devem ser incorporados ao projeto e operação do sistema de purificação de água (SAAD, 1992) para assegurar a análise periódica das diferentes etapas de purificação com relação ao controle dos padrões da água e da manutenção dos equipamentos para prevenir o crescimento microbiano no sistema.

Dado o grau de importância da qualidade da água na área da saúde, pretendeu-se aqui, alertar as indústrias e estabelecimentos de saúde, quanto à problemática da contaminação da água como um fator causador de injúria a pacientes e expor meios que possam ser de utilidade para a solução de problemas e controle da qualidade da água utilizada.

1.9.2. Parâmetros para a água purificada e água para injeção (USP 30)

Parâmetro	Água purificada	Água para injeção
Condutividade	< 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ at 25°C	< 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ at 25°C
Carbono orgânico total (TOC)	< 0,5 ppm	< 0,5 ppm
Bactérias	100 UFC/mL	10 UFC/100mL
Endotoxinas	Não especificado	< 0,25 UE/mL

Quadro 6. Parâmetros para a água purificada e água para injeção (USP 30).

1.9.3. Outras águas destinadas à área da saúde

Água para hemodiálise – é a água que atende aos requisitos da água potável e que foi submetida a um tratamento adicional, por processo apropriado, para reduzir componentes químicos e microbiológicos. Não contém nenhum antimicrobiano adicionado e não é destinada a injeção.

Água purificada estéril – é água purificada esterilizada e empacotada apropriadamente. Não contém nenhum agente antimicrobiano. Não deve ser usada

em preparações destinadas à administrações parenterais. Para tais finalidades usar água para injeção, água bacteriostática para injeção, ou água estéril para injeção.

Água para a injeção – é obtida através da água potável que foi purificada por um processo de purificação adequado para remoção de produtos químicos e microrganismos. Não contém nenhuma substância adicionada e é utilizada na preparação de soluções parenterais.

Água estéril para irrigação – é preparada a partir da água para injeção, esterilizada e empacotada apropriadamente. Não contém nenhum agente antimicrobiano ou outra substância adicionada.

Água estéril para inalação – é preparada com água para injeção, esterilizada e empacotada apropriadamente. Não contém nenhum agente antimicrobiano, a não ser que seja utilizada em umidificadores ou dispositivos similares. Não deve ser usada para administração parenteral.

Água bacteriostática para injeção – é preparada a partir da água para injeção, esterilizada e empacotada apropriadamente, contendo um ou mais agentes antimicrobianos. Deve-se usá-la com a devida consideração quanto à compatibilidade dos agentes antimicrobianos com a substância medicinal nela dissolvida ou diluída.

1.10. Aplicação

A manufatura de produtos médico-hospitalares emprega o uso da água purificada para lavar componentes termoplásticos injetados (cilindros, tampas, filtros, e reservatórios, antes do uso na linha de montagem) e também em testes para a detecção de possíveis vazamentos no produto. Os componentes termoplásticos

injetados são usados na manufatura de artigos médico-hospitalares tais como oxigenadores de sangue usados em operações cardiopulmonares com circulação extracorpórea (RGERS *et al.*, 2005).

Os oxigenadores de sangue, uma vez manufaturados, são esterilizados por gás óxido de etileno (ETO). Entretanto, o processo de esterilização não elimina materiais particulados e contaminantes microbianos, tais como restos celulares e endotoxinas bacterianas que causam reações pirogênicas nos pacientes. Estes contaminantes são removidos dos componentes dos oxigenadores de sangue lavando-os com água purificada antes de serem montados (Figura 4. (A) e (B)).

Figura 4. (A) Componentes termoplásticos injetados; (B) Oxigenador VitalTM

A manutenção de sistemas de purificação de água exige a limpeza e sanitização rotineira de cada estágio do sistema de purificação para remover material particulado acumulado e impedir o crescimento bacteriano. Os contaminantes geralmente provêm da água de alimentação do sistema e diminuem a eficiência do sistema e aumentam o custo da produção de água purificada (MALTAIS e STERN, 2001; REDONDO e LOMAX, 2001).

A contaminação microbiológica pode também ser evitada melhorando o desempenho do sistema de determinados elementos do sistema de purificação de água. Os espaços inoperantes (pontos mortos) devem ser eliminados, pois

promovem a formação bacteriana e crescimento de biofilmes pelo acúmulo de água parada.

Para aumentar o nível de pureza da água e vida útil dos equipamentos de filtração, é essencial que a sanitização seja realizada rotineiramente, em todos os estágios do sistema, com agentes químicos que conduzem à morte dos microrganismos (PENNA *et al.*, 2001).

2. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho constituiu em avaliar, sistematicamente, o sistema de purificação de água de uma indústria médico-hospitalar e seus procedimentos de limpeza e sanitização.

Com esta finalidade, foi realizada análise microbiológica que compreendeu a contagem heterotrófica no período de 2003 a 2006 e o isolamento e identificação dos microrganismos contaminantes do sistema, com intuito de melhorar o desempenho de cada estágio do processo de purificação, para prevenir a recontaminação bacteriana na água purificada.

3. DESCRIÇÃO DA INDÚSTRIA

3.1. *Edwards Lifesciences*

Sediada na Califórnia, EUA, a Edwards Lifesciences Corporation projeta, desenvolve e comercializa uma linha completa de produtos e serviços para tratamento de doença cardiovascular em estágio terminal (EDWARDS, 2007). Como líder mundial em fornecimento de válvulas cardíacas de tecido para reposição e produtos de reparos de válvulas cardíacas, a companhia focaliza quatro áreas principais: cirurgia cardíaca, atendimento crítico, sistemas vasculares e produtos e serviços de perfusão.

No Brasil desenvolveu, comercializou e vendeu oxigenadores e acessórios destinados a cirurgias de coração utilizando circulação extracorpórea.

Em dezembro de 2006 transferiu a título de venda, todo o “business” de oxigenadores à Nipro Medical, incluindo patentes de produtos.

3.2. Nipro Medical

A Nipro Medical é a subsidiária da Nipro Corporation, sediada em Osaka, Japão, direcionada à área médica, que inclui a manufatura e o comércio de dispositivos para diálise, agulhas de insulina, infusão, monitoração de açúcar no sangue e produtos do sistema circulatório (NIPRO, 2007).

A divisão médica é a maior unidade da Nipro e soma 44% do rendimento total da companhia. Sua divisão farmacêutica representou 17% das vendas em 2005.

A companhia opera em 37 locais, com 4 bases de manufaturas e 34 pontos de venda. Nos últimos anos, a Nipro tem expandido em número de manufaturas e capacidade de produção global.

A divisão médica foi expandida, em dezembro de 2006, com a aquisição do negócio de produtos para perfusão da Edwards Lifesciences.

No Japão, a Nipro possui dois centros de pesquisa e três fábricas. No Brasil, sua subsidiária localiza-se em Sorocaba e pretende ampliar o mercado da área cardiopulmonar, com produção em São Paulo – SP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sistema de purificação

O sistema de purificação de água, objeto deste estudo, compreende três etapas principais: Pré-tratamento, Purificação, Estocagem/Distribuição. Os pontos de amostragem para análise microbiológica estão distribuídos em cada estágio do sistema de purificação de água (Quadro 7 e Figura 5).

Estágios do sistema de purificação		Pontos de amostragem
Pré-tratamento	Entrada de água potável	I
	Filtros multimeios	II
	Abrandadores	III
	Filtro de carvão ativado	IV e V
Purificação	Osmose reversa	VI
	Deionizador	VII
Estocagem e distribuição	Tanque de estocagem	VIII
	Lâmpada ultravioleta	IX
	Filtros 0,05µm	X
	Consumo – Teste de vazamentos*	XI
	Consumo – Lavadora automática**	XII
	Consumo – Pia**	XIII

Quadro 7. Estágios do sistema de purificação de água.

*Teste realizado para detecção de vazamentos em câmaras de oxigenação de sangue.

**Lavadora automática e pia para lavagem, localizadas no interior de sala limpa classe 100.000 (ISO 08).

Figura 5. Detalhe dos estágios do sistema de purificação de água. (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

No processo de purificação, a água proveniente do sistema de abastecimento público (I) é armazenada em um reservatório de fibra de vidro com capacidade para 10.000 litros de água. Uma bomba de 413 kPa de pressão, com fluxo de 34 L/min, pressuriza a água através do sistema de purificação (U.S. Filter, Lowell, MA, USA).

Chegando ao sistema de purificação, a água passa por dois filtros multimeios (II) em paralelo, compostos por níveis de antracito, areia, granada e cascalho, capazes de remover material particulado maior que 10µm e segue através de dois abrandadores (III) de sódio alternados, que removem a dureza da água por meio da troca de íons cálcio e magnésio por íons sódio. As resinas de troca iônica dos abrandadores são alimentadas automaticamente por um tanque com salmoura.

Uma vez abrandada, a água atravessa um filtro de carvão ativado (IV e V), que remove o cloro da água para que não danifique as membranas de osmose reversa, sensíveis ao cloro.

A água passa através de um filtro de 5µm que retém impurezas e, então, alcança a unidade da osmose reversa (VI), onde é forçada por pressão, a atravessar tangencialmente as membranas, que removem aproximadamente 97% de sólidos dissolvidos, bactérias, endotoxinas e matéria orgânica.

A etapa seguinte é a passagem da água através de duas colunas paralelas de resina mista de troca aniônica e catiônica (VII) para remover os íons que não foram retidos pelas membranas de osmose reversa. A água segue para um tanque de armazenamento (VIII) com capacidade para 1.500 litros de água, equipado com um dispositivo em forma de esfera pulverizadora (“spray ball”) para alívio de pressão ou vácuo que mantém as paredes internas do tanque constantemente molhadas para impedir o crescimento bacteriano.

A água armazenada neste tanque circula continuamente, passando sob uma lâmpada ultravioleta de 254 nanômetros (IX) que minimiza a proliferação microbiológica, e então atravessa três filtros microbiológicos de 0,05 µm (X) que retêm microrganismos e pirogênios.

Um volume de aproximadamente 3.000 litros de água purificada é produzido diariamente.

A água é distribuída aos pontos do uso (XI, XII, XIII), no interior de uma Sala Limpa (classe 100), onde são manufaturados os produtos médico-hospitalares destinados a cirurgias cardiovasculares.

4.2. Análise microbiológica

Em intervalos previamente estabelecidos, cada ponto de amostragem foi sanitizado com álcool 70% filtrado e 100 mL de amostra de água foram envasados

em sacos estéreis de polietileno (Figura 6) do tipo Whril-Pak® (Nasco, Modesto, CA, EUA).

Figura 6. Coleta de amostra de água

A análise microbiológica da água coletada nos pontos de I a XIII foi realizada por meio de filtração à vácuo em membranas filtrantes de 0,45 µm que foram assentadas em placas de Petri contendo meio de cultura R2A Ágar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) para contagem de heterotróficos e meio de cultura m-Endo (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), para contagem de coliformes (Figura 7. A e B).

Figura 7. (A) Assentamento de membrana filtrante sobre agar. (B) Unidades Formadoras de Colônia

As placas foram incubadas em posição invertida, respectivamente à temperatura de $33\pm2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas (contagem de heterotróficos) e $35.0\pm0.5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas (contagem de coliformes). Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC/100 mL) presentes na superfície das membranas filtrantes foram contadas.

Para a contagem total, foi considerado o máximo de 300 unidades formadoras de colônia na superfície das membranas filtrantes. As colônias de coliformes fecais exibem uma cor rósea a vermelho escuro, com um brilho verde-metálico, quando em meio seletivo.

As colônias foram selecionadas e isoladas, transferindo-se cada colônia individualmente para placas de Petri contendo meio de cultura TSA e incubando-as a 30-35°C por 18-24 h.

4.3. Identificação microbiana

As colônias desenvolvidas foram avaliadas morfológicamente e submetidas aos testes de oxidase e indol, seguidas por testes bioquímicos de identificação de gênero e espécie, usando-se os micro-métodos padronizados BBL™ Crystal™ (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) para identificação de microrganismos (Figura 8).

Figura 8. BBL™ Crystal™ - Kit para identificação de microrganismos.

Com a técnica de coloração de Gram, as unidades formadoras de colônias isoladas são identificadas como Gram-negativa ou Gram-positiva.

Para a identificação dos microrganismos Gram-negativos foram utilizados os painéis *BBL™ Crystal™ Enteric/Non-Fermenter* e para os Gram-positivos foram utilizados os painéis *Gram-positive BBL™ Crystal™*.

Os micro-métodos empregados são modificações de métodos clássicos de identificação microbiana e seus princípios básicos são reações bioquímicas e enzimáticas realizadas com cepas-padrão.

A interpretação das reações foi realizada de acordo com a leitura da alteração de cores, resultantes das reações bioquímicas nos substratos específicos do painel, com mudança do pH.

Esta leitura gera um perfil numérico que é comparado com os perfis padrões da base de dados do software para o sistema de identificação BBL™ Crystal™.

A identificação de microrganismos é dificultada não só devido ao seu tamanho microscópico, mas, também, porque muitos são transparentes ou praticamente incolores. Para observá-los e diferenciá-los é necessário recorrer primeiramente às técnicas de coloração.

Um dos métodos de coloração mais utilizados é a coloração de Gram, desenvolvida pelo dinamarquês Christian Gram em 1884. Este método permite dividir as bactérias nas classes Gram-positivas e Gram-negativas (Anexo 1).

Esta diferenciação está relacionada à diferente estrutura, composição e teor lipídico presente na parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

4.3.1. Sistema BBL™ Crystal™ para identificação rápida de microrganismos

Os micro-métodos para a identificação bioquímica dos microrganismos são relatados desde 1918.

O interesse em sistemas miniaturizados de identificação trouxe grande vantagem por requerer pouco espaço, vida útil prolongada e fácil utilização.

Muitos dos testes usados nos sistemas BBL™ Crystal™ são modificações de métodos clássicos e incluem testes para fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos.

O resultado de um teste padrão, para cada microrganismo, convertido numericamente e armazenado em uma base de dados é usado como a base para identificação (Figura 9 e 10).

A identificação é obtida a partir de uma análise comparativa entre o teste de reação do microrganismo padrão àqueles investigados.

Figura 9. Tela para introdução do perfil gerado pelo Kit BBL™ Crystal™

Figura 10. Tela para visualização da identificação microbiana gerada pelo Kit BBL™ Crystal™

4.3.1.1 Sistema para identificação rápida de Gram-positivos

Este sistema tem possibilita identificar até 88 microrganismos gram-positivos clinicamente importantes.

O sistema para identificação rápida de Gram-positivos BBL™ Crystal™ é um método miniaturizado de identificação, que emprega substratos convencionais modificados, fluorogênicos e cromogênicos, para identificação de bactérias Gram-positivas aeróbicas.

O kit contém 29 substratos desidratados e um controle de fluorescência dispostos em poços de reação em um cassete plástico. O inóculo é preparado para encher todos os poços de reação, que re-hidrata os substratos e inicia a reação (Figura 11).

Depois do período de incubação, os poços são examinados quanto à mudança de coloração e presença de fluorescência que resultam das atividades metabólicas dos microrganismos.

Figura 11. Manipulação do Kit BBL™ Crystal™ - (1) Alçada de crescimento microbiano em agar TSA. (2) Transferência para tubo com soro fisiológico 0,9%. (3) Homogeneização. (4) Recolhimento do inóculo com pipeta de Pasteur. (5) Transferência do inóculo para o kit. (6) kit inoculado.

4.3.1.2 Sistema para identificação rápida de Gram-negativos

Este sistema permite identificar bactérias Gram-negativas aeróbicas clinicamente significativas que pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, assim como, bacilos Gram-negativos não-fermentadores mais freqüentemente isolados.

O sistema para identificação rápida de Gram-negativos é um método miniaturizado de identificação que emprega substratos convencionais modificados e cromogênicos para detectar enzimas que os microrganismos utilizam para metabolizar vários substratos.

O kit contém 30 substratos desidratados dispostos em poços de reação em um cassete plástico. O inóculo é preparado para encher todos os poços de reação,

que re-hidrata os substratos e inicia a reação. Testes adicionais de oxidase (Anexo 2) e indol (Anexo 3) são necessários para facilitar e aumentar o grau de confiança da identificação.

Depois do período de incubação, os poços são examinados quanto à mudança de coloração que resultam das atividades metabólicas dos microrganismos.

4.4. Teste de endotoxinas pelo método gel-clot (LAL)

As amostras de água são coletadas em frascos de vidro esterilizados por calor seco (despirogenização), identificadas e levadas ao laboratório.

O teste é feito em duplicata e inclui a amostra a ser testada, um controle positivo, um controle negativo e uma curva padrão.

Há dois tipos de técnicas para o teste de endotoxinas descritos pela Farmacopéia Americana (USP 30, 2007): a técnica de gel-clot (Lisado de Amebócitos de *Limulus* - LAL), com base na formação de gel, e a técnica fotométrica. Nesta última incluem-se o método turbidimétrico, com base na da turbidez, e o método cromogênico, baseado na alteração de coloração.

A técnica do gel-clot (Anexo 4) utiliza extrato de amebócitos obtido do caranguejo em ferradura (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*) que foi preparado e caracterizado para o uso como “Reagente LAL”. Baseia-se na formação do gel quando na presença de endotoxinas bacterianas.

4.5. pH, condutividade e substâncias oxidáveis

A leitura do valor de pH (USP 30, 2007) é executada utilizando-se um instrumento potenciômetro (pHmetro) da marca Metrohm, modelo 744 (Oberdorfstr, Herisau, Switzerland).

A condutividade (USP 30, 2007) elétrica na água é uma medida de íons dissociados na água que varia em função do valor de pH e da temperatura.

Estes íons têm impacto significativo na pureza química da água em seu propósito para uso em aplicações farmacêuticas.

A condutividade é medida por um condutivímetro da marca Orion modelo 105 (Beverly, MA, EUA). Devido à temperatura ter um impacto substancial nas leituras de condutividade, este instrumento possui um sistema automático de compensação de temperatura, para indicar o valor real que teoricamente seria observado na temperatura nominal de 25°C.

O teste de substâncias oxidáveis (Anexo 5) substitui os testes de medição de carbono orgânico total (TOC). As moléculas orgânicas são introduzidas na água de entrada por fontes diversas. Nos sistemas de purificação e nos sistemas de distribuição, podem ser introduzidas por biofilmes que se desenvolvem no sistema.

5. LIMPEZA E SANITIZAÇÃO

A limpeza e a sanitização de todos os estágios do sistema de purificação de água (Tabela 1) foram realizados semestralmente, ou após a interrupção da operação do sistema por tempo superior a 24 horas, ou após procedimentos de manutenção operacionais, ou quando resultados microbiológicos foram insatisfatórios (U.S. FILTER, 1995).

A limpeza dos filtros multimeios, dos abrandadores e do filtro de carvão, foi feita com solução de Bissulfito de sódio à 1% (m/v) com um tempo de contato de 90 minutos. Um pré-filtro de 5 μ m (Figura 12) foi utilizado entre o filtro de carvão ativado e a osmose reversa, pois o carvão ativado granular comumente libera uma grande quantidade de partículas que pode danificar as membranas de osmose reversa. Na ocasião das sanitizações, este filtro foi substituído por filtro novo.

Figura 12. Reposição do filtro 5 μ m. Filtro usado (esquerda) e filtro novo (direita)

Na sanitização das membranas de osmose reversa, inicialmente foi feita uma limpeza com solução de Hidróxido de sódio à concentração de 0,4% (m/v), com um tempo de contato de 30 minutos. Em seguida, uma solução de ácido cítrico na concentração de 2,2% (m/v) permanece em contato por 30 minutos sobre as

membranas e então foi executada a sanitização com Proxitane 1512[®] (Peróxidos do Brasil Ltda., Curitiba, PR, BR) na concentração de 1% (v/v) e tempo de contato de 180 minutos.

O Proxitane 1512[®] é uma mistura em equilíbrio contendo ácido peracético (15%), peróxido de hidrogênio (23%), ácido acético (16%) e veículo estabilizante. É efetivo contra uma larga variedade de microrganismos, oxidando componentes imprescindíveis à sobrevivência de bactérias, vírus, fungos e esporos bacterianos.

O tanque de estocagem e o “loop” de distribuição foram sanitizados com solução de Hipoclorito de sódio à concentração de 0,4% e tempo de contato de 240 minutos.

Tabela 1. Procedimento de limpeza e sanitização de cada estágio do sistema de purificação de água.

Estágios	Componentes	Pontos de amostragem	Agentes químicos	Tempo de contato
Pré-Tratamento	Água potável	I	-	-
	Filtros multimeios	II	Bissulfito de sódio 1%	90 min
	Abrandadores	III	Bissulfito de sódio 1%	90 min
	Filtro de carvão	IV e V	Bissulfito de sódio 1%	90 min
	Filtro 5µm	-	-	-
Tratamento	Osmose Reversa	VI	Proxitane [®] 1%	180 min
	Deionizador	VII	-	-
Estocagem e Distribuição	Tanque de estocagem	VIII	Hipoclorito de sódio 0,4%	240 min
	Lâmpada U.V.	IX	-	-
	Filtros 0,05µm	X	Hipoclorito de sódio 0,4%	240 min
	Pontos de uso	XI, XII e XIII	Hipoclorito de sódio 0,4%	240 min

6. RESULTADOS

6.1 *Contagens heterotróficas*

O equipamento do sistema de purificação de água estudado integra operacionalmente todos os estágios necessários para produzir água purificada utilizada no processo de lavagem de componentes termoplásticos para montagem de oxigenadores de sangue. A água purificada também é usada em testes contra vazamentos nestes oxigenadores, com propósito de garantir a manufatura de um produto seguro, integrante de cirurgias cardíacas bem sucedidas.

Este estudo monitorou o sistema de purificação de água, através de análises microbiológicas e físico-químicas durante o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2006, com o propósito de avaliar a qualidade microbiológica da água produzida, identificando os pontos críticos de contaminação, perda de capacidade operacional dos componentes do sistema e eficiência dos procedimentos da limpeza e sanitização (Tabela 2).

Tabela 2. Contagens heterotróficas ($\log_{10}$ UFC/100mL) dos estágios do sistema de purificação.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Dez/02 - Antes da sanitização	1,52	0,48	0,00	0,00	0,85	1,52	1,41	0,00	1,97	1,83	0,00	0,60	1,45
Jan/03 - Após a sanitização	1,60	2,06	0,78	1,83	2,26	1,68	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Fev/03	0,78	2,34	0,60	2,42	2,43	0,60	1,53	1,60	1,30	1,56	1,81	1,90	1,41
Mar/03	1,96	1,15	1,08	1,45	1,88	0,30	2,14	2,20	2,11	2,07	0,60	0,30	0,60
Abr/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	0,60	0,30
Jun/03	1,75	2,30	2,21	0,78	1,15	0,30	2,56	2,09	1,86	0,60	1,30	0,30	0,30
Set/03	1,83	0,00	1,89	2,35	2,78	1,38	2,75	2,19	2,56	0,90	0,30	0,00	1,00
Out/03	-	-	-	-	-	2,53	2,47	2,48	2,44	2,53	0,60	0,78	0,30
Dez/03 - Antes da sanitização	1,70	2,36	2,25	2,43	1,58	1,08	2,37	2,26	2,48	2,20	0,00	0,30	1,79
Jan/04 - Após a sanitização	2,51	1,34	1,92	2,70	3,88	0,30	2,00	1,73	0,78	0,00	0,00	0,30	0,78
Fev/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,15	1,00	1,30
Abr/04	2,32	2,79	1,48	2,85	2,09	0,00	-	1,95	1,30	0,30	0,00	0,30	0,00
Jun/04	1,89	0,30	1,60	3,30	3,40	1,08	-	2,11	2,05	0,90	1,85	1,00	1,26
Jul/04	1,73	1,20	0,78	3,32	3,26	1,20	-	1,92	1,62	0,78	1,83	1,92	1,98
Jul/04	1,66	1,20	1,83	3,51	3,38	1,20	-	1,51	1,62	0,78	1,08	0,90	1,00
Ago/04	2,15	1,26	1,15	3,34	2,48	1,45	-	2,11	2,45	2,16	0,90	0,60	0,78
Set/04	2,78	2,43	2,60	3,40	3,95	1,26	-	2,30	1,60	0,00	1,20	1,00	0,60
Out/04	2,00	2,00	2,70	2,95	3,28	1,38	-	2,70	2,00	1,30	0,00	1,00	0,00
Nov/04	2,38	2,56	3,43	3,78	3,68	0,60	-	1,91	1,58	0,90	0,60	0,30	0,30
Dez/04 - Antes da Sanitização do Pré-tratamento	3,08	3,57	3,75	4,24	3,88	1,08	-	2,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dez/04 - Após a Sanitização do Pré-tratamento	2,34	3,06	3,49	3,36	3,76	1,48	-	2,09	1,58	2,06	0,00	0,60	1,08
Jan/05	2,60	2,60	3,92	4,23	4,42	1,00	-	2,23	1,62	0,30	0,60	0,30	0,90
Fev/05 - Antes da sanitização do Estágio de Tratamento	2,78	3,00	3,30	4,08	3,90	0,00	-	2,01	0,90	0,00	0,00	1,15	1,86
Fev/05 - Após da sanitização do Estágio de Tratamento	2,18	3,48	3,70	4,58	4,60	0,00	-	2,15	1,34	0,00	2,21	1,00	1,00
Fev/05 - Antes da sanitização do estágio de Estocagem e Distribuição	2,70	3,48	3,60	3,30	4,20	0,00	-	1,20	1,89	1,70	1,76	0,30	1,15
Fev/05 - Após a sanitização do estágio de Estocagem e Distribuição	2,38	3,30	3,60	3,90	3,70	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mar/05	2,51	2,85	3,51	4,04	3,90	0,30	-	1,94	1,73	0,78	1,32	0,30	0,60
Abr/05	2,41	2,70	3,46	3,95	3,78	0,78	-	1,79	1,62	1,15	0,90	0,00	1,08
Mai/05	2,63	2,78	3,04	4,00	3,85	1,26	-	1,91	1,88	1,38	1,15	0,78	1,08
Jun/05	3,17	1,90	3,24	4,97	4,81	1,53	-	2,16	2,04	0,78	1,15	0,30	0,00
Jul/05 - Antes da sanitização	2,30	1,74	2,70	3,78	3,48	0,00	-	2,06	2,31	0,00	1,48	0,30	0,00
Jul/05 - Após a sanitização	1,60	1,51	1,08	2,60	2,00	1,43	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Jul/05 - 3 Dias Após a Sanitização	2,76	1,95	1,48	3,36	3,00	1,00	-	1,83	0,48	0,48	0,70	0,00	0,00
Ago/05	2,49	3,29	2,70	3,78	4,20	1,23	1,53	1,99	0,70	0,48	1,18	0,00	0,00
Set/05 - Antes da sanitização do Pré-tratamento	3,08	2,57	2,45	3,00	2,82	1,56	1,81	0,90	0,00	0,95	1,40	0,00	0,90
Set/05 - Após a sanitização do Pré-tratamento	3,48	2,71	2,67	4,18	4,31	1,38	1,80	1,49	1,51	0,78	1,04	0,00	0,00
Out/05	2,78	2,62	3,20	4,04	4,18	0,90	1,73	1,34	1,15	0,78	0,95	0,30	0,00
Dez/05 - Antes da sanitização	2,00	1,30	2,30	2,30	3,45	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dez/05 - Após a sanitização	2,20	2,79	3,02	3,18	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Jan/06	2,72	2,93	2,29	4,03	4,17	0,90	1,72	0,90	0,00	0,48	1,36	0,00	0,30
Fev/06	2,54	2,45	2,38	4,09	4,12	0,30	1,20	1,00	0,00	0,00	0,78	0,00	0,00
Mar/06	2,86	2,60	2,53	3,78	3,60	0,60	1,00	1,20	0,00	1,08	0,90	0,60	0,00
Abr/06	2,73	2,69	2,41	3,95	3,90	1,08	1,34	1,08	0,95	0,70	0,30	0,00	0,00
Mai/06	2,92	2,79	2,43	4,15	4,23	1,26	1,20	1,20	1,30	0,90	0,60	0,70	0,30
Jun/06	2,57	2,59	2,32	4,04	3,85	0,90	1,45	0,60	0,78	0,30	0,00	0,00	0,30
Jul/06	2,84	2,61	2,59	3,90	4,00	0,60	1,08	0,70	0,60	0,60	0,00	0,00	0,00
Ago/06 - Antes sanitização	2,85	2,74	2,45	4,00	3,95	0,00	0,78	0,48	0,95	0,30	0,00	0,00	0,00
Ago/06 - Após a sanitização	2,93	1,88	1,90	2,41	2,28	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,30
Set/06	2,73	1,75	1,96	2,28	2,36	0,00	1,08	0,30	0,00	0,30	0,30	0,00	0,00
Out/06	2,86	1,83	2,16	2,57	2,20	0,60	0,90	0,60	0,30	0,30	0,70	0,00	0,30
Nov/06	3,01	1,94	2,06	2,26	2,32	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dez/06 - Antes da sanitização	2,89	1,92	1,81	2,34	2,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,30
Dez/06 - Após a sanitização	2,95	1,86	1,83	2,30	2,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00

Substituído por leitos de resina de troca aniônica e catiônica

(I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

Em janeiro de 2003, após a sanitização completa do sistema de purificação, a carga microbiana de 1,60 $\log_{10}$, arrastada com a água de entrada, fornecida pelo abastecimento municipal (I), foi elevada para 2,26 $\log_{10}$ no filtro de carvão ativado (IV e V) e reduzida 1,68 $\log_{10}$ pelas membranas de osmose reversa (VI).

Deste estágio em diante, a carga microbiana foi reduzida a 0,30 $\log_{10}$ nas etapas subseqüentes (VII, VIII, IX, X) e este valor foi mantido aos pontos do uso (XI, XII, e XIII).

A sanitização completa do sistema foi capaz de reduzir um ciclo logarítmico a carga microbiana no deionizador (VII) e etapas subseqüentes. Entretanto, o processo de limpeza dos equipamentos, que compõem o Pré-tratamento, não foi eficiente entre a água de entrada e o filtro de carvão ativado, como mostra a Figura 13.

Figura 13. Contagens heterotróficas – dezembro de 2002 e janeiro de 2003 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05 μ m, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

Entre janeiro de 2003 a janeiro 2004, um aumento de aproximadamente 2 $\log_{10}$ foi observado na carga microbiana após a passagem através do deionizador. Mesmo após os procedimentos de sanitização, o deionizador, exibiu diferencial de

pressão alto, devido à saturação de suas membranas, que impediram sua regeneração. Após as membranas de osmose reversa, a água permeada era recontaminada, e conseqüentemente os pontos do consumo alcançaram cargas microbianas ao nível da água de entrada ($1,7 \log_{10}$).

Em fevereiro de 2003, a carga de $2,42 \log_{10}$ proveniente do filtro de carvão ativado foi reduzida aos níveis de $0,60 \log_{10}$ pela osmose reversa e aumentada a $1,53 \log_{10}$ na unidade de deionização, permanecendo neste nível nos pontos de uso.

Em março de 2003, a carga de $1,88 \log_{10}$ presente no filtro de carvão ativado foi reduzida a $0,30 \log_{10}$ após a passagem pela osmose reversa e aumentada, com a passagem pelo deionizador, a $2,14 \log_{10}$. Esta biocarga foi reduzida novamente a $0,30 \log_{10}$ após a passagem através dos filtros $0,05 \mu\text{m}$.

Em junho de 2003, a biocarga de $1,15 \log_{10}$ que presente no filtro de carvão foi reduzida mais uma vez a $0,30 \log_{10}$ na unidade de osmose reversa. Entretanto, aumentou para $2,56 \log_{10}$ na unidade de deionização e retornou a $0,30 \log_{10}$ após a passagem pelos filtros $0,05 \mu\text{m}$.

Do mês de setembro de 2003 a dezembro de 2003, a carga microbiana após a osmose reversa, foi aumentada em $1,0 \log_{10}$, atingindo valores de até $2,53 \log_{10}$ nos filtros $0,05 \mu\text{m}$, o que acarretou a presença de até $1,79 \log_{10}$ de biocarga nos pontos de consumo.

A capacidade da unidade de osmose reversa em reduzir mais de 2 ciclos logarítmicos a carga microbiana proveniente do filtro de carvão ativado diminuiu para 1 ciclo logarítmico, como observado no período de junho de 2003 a dezembro de 2003, devido à saturação das membranas de osmose reversa.

Embora a população microbiana em dezembro de 2003 não excedesse $2,50 \log_{10}$, em janeiro de 2004, após a sanitização completa do sistema de purificação de

água, a unidade de carvão ativado aumentou para 3,88 $\log_{10}$ a carga microbiana proveniente dos filtros multimeios (1,34 $\log_{10}$).

Esta biocarga foi então reduzida a níveis tão baixos quanto 0,30 $\log_{10}$ (Figura 14), enfatizando a eficiência do ácido peracético na sanitização das membranas de osmose reversa.

Por outro lado, a unidade de deionização introduziu novamente cerca de 2 ciclos logarítmicos de contaminação microbiana na água, que foram removidos pelos filtros 0,05 μm , sendo mantidos níveis inferiores a 1,0 $\log_{10}$ nos pontos de consumo.

A eficiente sanitização do tanque de estocagem, dos filtros 0,05 μm , e dos pontos do consumo, com Hipoclorito de sódio, resultou na diminuição da população heterotrófica.

Figura 14. Contagens heterotróficas – dezembro de 2003 e janeiro de 2004 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05 μm , XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

O deionizador mostrou ser uma fonte de contaminação da água após as membranas de osmose reversa, uma vez que a sanitização com ácido peracético não era suficiente para manter os níveis microbianos alcançados pela osmose

reversa, culminando na substituição desta unidade, em fevereiro de 2004, leitos de resina de troca aniônica e catiônica.

Nos meses subseqüentes a julho de 2004, apesar da ocorrência de nova sanitização do sistema de purificação de água com limpeza do filtro de carvão ativado com solução de Bissulfito de sódio a 1% (tempo de contato: 30 minutos em circulação e 60 minutos em repouso), não houve redução da carga microbiana presente no filtro de carvão, que permaneceu superior a $3,0 \log_{10}$ e alcançou $4,24 \log_{10}$ em dezembro de 2004 e assim mantendo-se nos meses seguintes, até agosto de 2005.

O tanque de estocagem e distribuição apresentou uma população microbiana que permaneceu ao nível de $2,00 \log_{10}$, mas que foi reduzida entre 1 e 2 ciclos logarítmicos, permitindo que a água alcançasse os pontos do uso com uma população microbiana de 2 a 10 UFC/100mL.

Em dezembro de 2004 foi realizada uma sanitização parcial no sistema de purificação de água (somente nos pontos II, III, IV, e V), que não reduziu significativamente as contagens microbianas nas diferentes etapas subseqüentes. Por exemplo, a carga microbiana presente no filtro de carvão ativado foi reduzida em apenas $1,0 \log_{10}$. Com as membranas de osmose reversa, houve redução adicional de mais $1,0 \log_{10}$ e a água pôde alcançar os pontos do uso com uma biocarga de aproximadamente $1 \log_{10}$ (Figura 15).

Figura 15. Contagens heterotróficas – novembro e dezembro de 2004 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

Em fevereiro de 2005, dando continuidade à sanitização iniciada em dezembro de 2004, uma sanitização foi conduzida (somente no ponto VI), e não foi suficiente para alcançar níveis abaixo de 10 UFC/100mL no tanque de estocagem.

Após ter deixado o filtro de carvão ativado com biocarga de 4,60 log₁₀, as membranas de osmose reversa retiveram toda esta biocarga na água. Entretanto, o nível microbiano aumentou em 2 log₁₀ após a permanência da água no tanque de estocagem (Figura 16).

Figura 16. Contagens heterotróficas – janeiro e fevereiro de 2005 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05 μ m, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

A sanitização parcial do sistema de purificação de água somente foi suficientemente capaz de manter os níveis heterotróficos abaixo de 1 UFC/100mL, a partir das membranas de osmose reversa até os pontos do uso, com a conclusão da sanitização nas etapas VIII, IX, X, XI, XII, e XIII. A sanitização destes estágios é importante para assegurar a redução de 4,0 log_{10} (Figura 17), conseguidos pela osmose reversa e por sua manutenção aos pontos do uso.

Figura 17. Contagens heterotróficas – Fevereiro/05 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

O tanque de estocagem, que pode aumentar o nível microbiano a níveis acima de 1 log₁₀, deve ser freqüentemente sanitizado para evitar sobrecarregar a capacidade de retenção dos filtros 0,05 µm, visto que a biocarga permaneceu em 1 log₁₀ durante os meses março a junho de 2005.

Em julho de 2005, a sanitização completa do sistema de purificação reduziu a carga microbiana da água em 1 log₁₀ (Figura 18) no filtro de carvão ativado e assegurou um nível abaixo de 10 UFC/100mL na água, após a passagem através das membranas de osmose reversa, mantendo este nível até os pontos do uso.

Figura 18. Contagens heterotróficas – junho e julho de 2005 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

No intuito de obter uma limpeza mais eficaz do leito de carvão ativado, em setembro de 2005 uma limpeza foi conduzida com solução de Bissulfito de sódio à 1% (m/v), com circulação desta solução por uma hora, numa taxa de fluxo de 34 L/minuto. Após este período, a solução foi drenada e substituída por uma nova solução de Bissulfito de sódio à 1% que permaneceu em circulação por mais uma hora. Após a drenagem desta solução de limpeza, foi feito enxágüe de 20 minutos com água potável.

Antes da limpeza com a solução de Bissulfito de sódio à 1%, a biocarga encontrada no filtro de carvão ativado era de 3,0 log₁₀ e após o enxágüe e já com o sistema em operação, uma nova contagem microbiana foi executada e encontrou uma biocarga de 4,31 log₁₀ no filtro de carvão ativado, mostrando que a limpeza com solução de Bissulfito de sódio à 1% não é eficaz à limpeza deste equipamento (Figura 19).

Figura 19. Contagens heterotróficas – agosto e setembro de 2005 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

A eficiência da sanitização completa é equivalente a sanitização parcial nas etapas VIII, IX, X, XI, XII, e XIII, isto é, ambos rendem os mesmos resultados. Conseqüentemente, toda sanitização deve incluir as etapas de estocagem e distribuição e seus pontos do uso, para assegurar uma redução significativa na população microbiana a níveis abaixo de 10 UFC/100mL, bem como a manutenção de tais níveis durante todo o sistema (Figura 20).

Figura 20. Contagens heterotróficas – dezembro de 2005 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

Em agosto de 2006 foram substituídas as cargas do filtro de carvão ativado e dos filtros multimeios, seguido de nova sanitização do sistema de purificação de água. Os filtros do multimeios foram restituídos com cinco camadas de areia de diferentes granulometrias (Figura 21), em ordem decrescente a partir do fundo até o topo do cilindro.

Figura 21. Carga dos filtros de areia (1 - cascalho de 4,0 a 6,0 mm; 2 - areia de 2,4 a 4,0 mm; 3 - areia de 1,0 a 2,4 mm; 4 - areia de 0,30 a 1,0 mm; 5 - areia verde (Greensand) de 0,30 a 0,35 mm).

O carvão ativado foi restituído com uma carga de 34 quilogramas de carvão granulado de 8x30 mesh (Figura 22).

Figura 22. Carvão ativado granulado

Para conseguir a troca destas cargas, foi necessário remover os cilindros (torpedos) de sua composição no Pré-tratamento e drená-los com ajuda de jatos de água, até que a antiga carga fosse completamente removida de dentro do cilindro (Figura 23).

Figura 23. Drenagem dos cilindros (1 - Jato d'água para drenagem do carvão ativado; 2 - cilindro parcialmente drenado; 3 - visão externa do cilindro vazio; 4 - visão interna do cilindro vazio).

O acúmulo de sujidades pôde ser observado, quando da abertura das válvulas dos cilindros, expondo seus interiores. A água drenada juntamente com a antiga carga dos filtros multimeios, apresentou coloração de ferrugem, devido à grande retenção de ferro feita por este processo, além de uma infinidade de partículas em suspensão. Este fato não foi observado no filtro de carvão ativado. Nesta, a água dentro do cilindro estava isenta de partículas que pudessem ser observadas facilmente a olho nu.

Os cilindros vazios foram limpos e reposicionados no sistema de purificação. Com a ajuda de um cone, a nova carga foi introduzida nos cilindros, com o cuidado de deixar espaço suficiente na parte superior do cilindro, de modo que permitisse a expansão dos meios no momento das contralavagens realizadas periodicamente. As válvulas dos cilindros dos filtros multimeios foram fechadas e deixou-se correr fluxo de água através dos cilindros. Esta lavagem inicial foi necessária para remover partículas indesejáveis misturadas ao meio, bem como a lavagem da areia verde que desprende uma quantidade grande de pó que origina-se pelo atrito entre seus grânulos.

Quando o fluxo de água mostra-se límpido, indica que todas as partículas indesejáveis foram removidas e o sistema pode ser colocado em operação. Este mesmo processo foi realizado no filtro de carvão ativado com a nova carga.

Todas as conexões do Pré-tratamento foram restabelecidas e então, o processo da limpeza deste estágio foi iniciada, bem como também os outros estágios do sistema, com procedimento usual de sanitização.

Após a sanitização, foram coletadas amostras de água em cada um dos pontos de coleta no sistema de purificação, para a avaliação microbiológica.

Partindo da água de entrada, com uma carga microbiana de $2,93 \log_{10}$, foram observados $1,88 \log_{10}$ após os filtros multimeios, $1,90 \log_{10}$ após os abrandadores, o filtro de carvão ativado apresentou $2,41 \log_{10}$ e $2,28 \log_{10}$ nos pontos IV e V respectivamente e, nos pontos subseqüentes às membranas de osmose reversa foram encontrados valores não superiores a $0,30 \log_{10}$ (Figura 24).

Figura 24. Contagens heterotróficas – julho e agosto de 2006 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

Os programas de sanitização foram importantes para garantir a manutenção da capacidade de purificação de água à qual o sistema é proposto.

Após a troca da carga do filtro de carvão ativado e filtros multimeios, o sistema mostrou redução da população microbiana presente nestas etapas e demonstrou regularidade de retenção microbiana pela osmose reversa, entre os intervalos de sanitização de julho e dezembro de 2006, assegurando níveis microbianos inferiores a 10 UFC/mL nos pontos de consumo de água purificada, neste período (Figura 25).

Figura 25. Contagens heterotróficas – novembro e dezembro de 2006 – (I – água de entrada, II – filtros multimeios, III – abrandadores, IV e V – filtro de carvão, VI – osmose reversa, VII – deionizador, VIII – tanque de estocagem, IX – lâmpada ultravioleta, X – filtros 0,05µm, XI – teste de vazamentos, XII – lavadora automática, XIII – pia de lavagem).

A manutenção de baixos níveis de biocarga da água no estágio de Pré-tratamento é importante para não sobrecarregar a capacidade de retenção microbiana das membranas de osmose reversa. Como observado entre janeiro e julho de 2006, entre 2 programas de sanitização, a biocarga da água de entrada era acrescida de 2,0 log₁₀ e atingia níveis de 4,0 log₁₀, saturando a capacidade das membranas reterem até 3,0 log₁₀ da biocarga proveniente do filtro de carvão ativado.

A troca das cargas dos filtros multimeios e carvão ativado reduziu em 2,0 log₁₀ a população microbiana proveniente da água de entrada do sistema nas etapas II e III e manteve a biocarga inferior a 3log₁₀ nas etapas IV e V. Esta biocarga foi totalmente removida da água na passagem pela osmose reversa e mantida até os pontos de consumo, caracterizando a estabilidade operacional do sistema de purificação (Figura 26).

Figura 26. Contagens heterotróficas – janeiro à dezembro de 2006 – (I – água de entrada, IV e V – filtro de carvão ativado).

6.2. Identificação de microrganismos

Os fatores que favorecem o crescimento bacteriano no sistema de purificação de água são “pontos mortos”, espaços com baixa circulação de água e o filtro de carvão ativado, que contribuem à formação de biofilmes extremamente difíceis de serem erradicados química ou fisicamente.

As bactérias Gram-negativas são os contaminantes mais frequentemente citados, seguidas de algumas bactérias Gram-positivas, encontrados na água de hemodiálise. *Pseudomonas spp* são geralmente as bactérias mais encontradas. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia* e *Pseudomonas vesicularis* foram encontrados em culturas de sangue de pacientes com reações pirogênicas e estes microrganismos também foram isolados da água da torneira e de dialisadores.

Arvanitidou (1998), em um estudo da qualidade microbiológica da água e de dialisatos em centros de hemodiálise na Grécia, isolou coliformes totais, coliformes

fecais, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus* e afirmou que estes microrganismos não deveriam ser encontrados normalmente na água tratada ou dialisatos, porque representam um fator de risco adicional para os pacientes submetidos à diálise.

Vorbeck-Meister (1999) analisou a água e as amostras da fileira após cada etapa do sistema de tratamento de água para diálise e não observou nenhuma bactéria de origem fecal. Encontrou *P. aeruginosa* na entrada de uma máquina de diálise e *P. aeruginosa* e *Enterococcus* na saída das máquinas de diálise.

Os microrganismos isolados (Figura 27), das amostras de água para a avaliação heterotrófica do sistema de purificação de água deste estudo, foram identificados através do kit BBL™ Crystal™ (Tabelas 3 e 4).

Uma maior quantidade de microrganismos foi identificada no estágio de pré-tratamento, após a água de entrada do sistema. Estes filtros realizam a filtração primária da água e retêm uma diversidade de microrganismos. A espécie *Flavimonas oryzae* (*Pseudomonas oryzae*) foi identificada em todos os estágios do sistema, mesmo após procedimentos de sanitização, indicando a possível formação de biofilme, causado por este agente.

I Água potável	Bergeyella zoohelcum	Flavimonas oryzihabitans	Leifsonia aquaticum		
II Filtros multimeios	Micrococcus luteus	Acinetobacter lwoffii	Pediococcus species	Flavimonas oryzihabitans	Chryseobacterium indologenes
III Abrandadores	Gardnerella vaginalis	Acinetobacter lwoffii	Pediococcus species	Flavimonas oryzihabitans	Chryseobacterium indologenes
IV e V Filtro de carvão	Pseudomonas putida	Acinetobacter lwoffii	Pediococcus species	Flavimonas oryzihabitans	Chryseobacterium indologenes
VI Osmose reversa	Myroides odoratus				
VII Deionizadores	Corynebacterium renale group	Flavimonas oryzihabitans			
VIII Estocagem/Distribuição	Myroides odoratus				
IX Lâmpada UV	Lactococcus raffinolactis	Micrococcus luteus			
X Filtros 0,05µ					
XI Consumo					
XII Consumo					
XIII Consumo	Flavimonas oryzihabitans				

Figura 27. Microrganismos isolados no sistema de purificação de água.

Tabela 3. Reações bioquímicas dos microrganismos Gram-negativos isolados do sistema de purificação de água.

Ingredientes ativos	Código	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	<i>Chryseobacterium indologens</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Myroides odoratus</i>	<i>Bergeyella zoohelcum</i>
Arabinose	ARA	-	-	-	-	-	-
Manose	MNS	-	-	-	+	-	-
Sacarose	SUC	-	-	-	-	-	-
Melibiose	MEL	-	-	-	-	-	-
Ramnose	RHA	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	SOR	-	-	-	-	-	-
Manitol	MNT	-	-	-	-	-	-
Adonitol	ADO	-	-	-	-	-	-
Galactose	GAL	-	-	-	+	-	-
Inositol	INO	-	-	-	-	-	-
p-n-p-fosfato	PHO	-	+	-	+	+	+
p-n-p α - β -Glucosídeo	BGL	-	+	-	-	-	-
p-n-p- β -Galactosídeo	NPG	-	-	-	-	-	-
Prolina nitroanilida	PRO	+	-	-	+	+	-
p-n-p bis-fosfato	BPH	-	-	-	+	+	-
p-n-p-xilosídeo	BXY	-	-	-	-	-	-
p-n-p- α -arabinosídeo	AAR	-	-	-	-	-	-
p-n-p-fosforilcolina	PHC	-	-	-	-	+	-
p-n-p- β -glucuronídeo	GLR	-	-	-	-	-	+
p-n-p-N-acetil glucosamidina	NAG	-	+	-	-	-	-
γ -L-glutamil p-nitroanilida	GGL	+	-	-	+	+	-
Esculina	ESC	-	-	-	-	-	-
p-nitro-DL-fenilamina	PHE	-	-	-	-	-	-
Uréia	URE	+	+	+	+	+	+
Glicina	GLY	+	+	+	+	+	+
Citrato	CIT	-	-	-	+	+	-
Ácido malônico	MLO	-	-	-	+	+	-
cloridrato de trifenil tetrazólio	TTC	-	-	-	+	+	-
Arginina	ARG	+	+	-	+	-	-
Lisina	LYS	+	+	-	-	-	-
Resultados de testes adicionais	Oxidase	-	+	-	-	+	+
	Indol	+	+	-	-	-	-

Tabela 4. Reações bioquímicas dos microrganismos Gram-positivos isolados do sistema de purificação de água.

Ingredientes ativos	Código	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Corynebacterium renale group</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Garnerella vaginalis</i>	<i>Leifsonia aquaticum</i>	<i>Pediococcus species</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Controle negativo fluorescente	FCT	Not applied	Not applied	Not applied	Not applied	Not applied	Not applied	Not applied
L-fenilamina-AMC	FPH	+	-	+	+	+	+	+
L-triptofano	FTR	+	-	+	+	+	+	+
4MU-fosfato	FHO	-	-	-	-	+	-	-
Trehalose	TRE	+	-	-	-	-	-	-
Sacarose	SUC	+	-	-	-	-	-	-
Arabinose	ARA	+	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-β-D-glucosídeo	BGL	+	-	-	-	+	-	-
p-nitrofenil-fosfato	PHO	-	-	-	+	+	+	+
Uréia	URE	-	-	-	-	-	+	+
4MU-β-D-glucosídeo	FGC	+	-	-	-	+	-	-
4MU-α-D-glucosídeo	FGS	+	-	-	+	+	-	+
L-arginina	FAR	+	-	+	+	+	-	+
4MU-β-D-glucuronídeo	FGN	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	LAC	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	MNT	+	-	-	-	-	-	-
Glicerol	GLR	-	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-β-D-celobiosídeo	PCE	+	-	-	-	-	-	-
p-nitrofenil-α-D-maltosídeo	PAM	+	-	-	+	+	-	-
Esculina	ESC	+	-	-	-	-	-	-
L-valina	FVA	+	-	-	-	+	+	+
L-ácido piroglutâmico-AMC	FPY	-	-	-	-	-	-	-
4MU-N-acetil-β-D-glucosaminídeo	FGA	+	-	-	-	-	-	-
L-isoleucina	FIS	+	-	-	-	+	+	-
Metil-α & β-glucosídeo	MAB	-	-	-	-	-	-	-
Maltotriose	MTT	+	-	-	-	-	-	-
Frutose	FRU	+	-	-	-	-	-	-
Prolina & Leucina-p-nitroalínida	PLN	+	-	+	+	+	+	+
o-nitrofenil-β-D-galactosídeo (ONPG) & p-nitrofenil-α-D-galactosídeo	PGO	+	-	-	-	-	-	-
Arginina	ARG	-	-	-	+	+	+	+
Teste de Gram	+Bacilo		X	X	X	X		
	+Coco	X					X	X

6.2.1. Gram-negativos

Pseudomonas oryzihabitans foram reclassificadas como *Flavimonas oryzihabitans*. São relacionadas a muitas infecções como a bacteremia, infecção do trato urinário, infecção de ferida, abscessos, conjuntivites, endocardites, desordem em diálise peritoneal ambulatorial contínua, meningites e infecções associadas a dispositivos invasivos em pacientes debilitados. *Pseudomonas* são encontradas em abundância como formas livres no solo, na água doce e em ambientes marinhos. Estas bactérias são clinicamente importantes porque são resistentes à maioria dos antibióticos e são capazes de sobreviver em circunstâncias que outros poucos organismos podem tolerar. Produzem também uma camada de limo resistente aos agentes desinfetantes (BENDIG, *et al.*, 1989).

Classificado previamente como *Flavobacterium spp*, a espécie *Chryseobacterium* pode ser multi-resistente e é associada à bacteremia, meningites, sépsis abdominal e a infecção de feridas (HSUEH, *et al.*, 1997).

A espécie *Acinetobacter* é associada com a infecção em pacientes debilitados. Podem ser multiresistentes e causam septicemia, infecção do trato urinário, abscessos, infecções de feridas, endocardites, meningites e osteomielites (BERGOGNE-BÉRÉZINE e JOLY-GUILLOU, 1991).

Myroides odoratus, classificado previamente como o *Flavobacterium spp*, é associado a infecções no trato urinário e a infecções de feridas (VANCANNEYT *et al.*, 1996).

A *Bergeyella zoohelcum*, classificada previamente como *Weeksella zoohelcum*, tem sido relacionada à mordidas de cães e gatos. As infecções relatadas são infecções de feridas, septicemias e meningites (REINA e BORRELL, 1992).

6.2.2. Gram-positivos

Lactococcus geralmente são isolados de seres humanos e são associados à bacteremia, endocardites e infecções do trato urinário (ELLIOTT *et al.*, 1991).

Corynebacterium foi isolado do material clínico e associado com as infecções tais como a septicemia, peritonites, infecção do olho, infecção de ferida, endocardites, osteomielites, meningites e abscessos. A *Leifsonia aquaticum* é chamada também de *Corynebacterium aquaticum* (FUNKE *et al.*, 1997).

A espécie do gênero *Gardnerella* associada a infecções é a espécie *G. vaginalis*, comumente associada com vaginoses bacterianas, sépsis intrauterina e neonatal (HILLIER, 1993).

Pediococcus são associados à bacteremias, abscessos e infecção pulmonar em pacientes debilitados (SARMA e MOHANTY, 1998).

Micrococcus é uma espécie comum na flora da pele. É associada à bacteremia, endocardites e artrites sépticas (PECES *et al.*, 1997).

6.3. Endotoxinas

Embora a Farmacopéia Americana (USP30, 2007) não estabeleça limite para concentração de endotoxinas na água purificada, foi adotado para o sistema de purificação de água estudo, o limite máximo de 1 UE/mL.

O limite de 0,25 UE/mL foi estabelecido, para a concentração de endotoxinas na água usada para diálise, pela Farmacopéia Americana (USP30, 2007).

Usando o método cromogênico de detecção de endotoxinas, Vorbeck-Meister (1999) mostrou que amostras da água de entrada apresentaram altos níveis de endotoxinas (0,56 – 9,10 UE/mL) e os níveis de endotoxinas eram frequentemente elevados após a passagem por leito de troca iônica (0,13 - >9,49 UE/mL) e o

tratamento com osmose reversa conduziu a uma diminuição satisfatória dos níveis de endotoxinas em todas as amostras ($<0,03$ UE/mL).

Não obstante, após a água passar através do sistema de tubulação das máquinas de diálise, um aumento na concentração de endotoxinas foi observado, assim como também os resultados das contagens de colônias.

No sistema de purificação de água, objeto deste estudo, os testes de endotoxinas pelo método do gel-clot (sensibilidade do reagente LAL 0,125 UE/mL) foram realizados em amostras de água nos pontos de consumo no interior da sala limpa (XI a XIII).

Nestes pontos os testes são realizados três vezes por semana os valores encontrados foram de $<0,125$ a 0,75 UE/mL.

Na água de entrada não são realizados testes de endotoxinas rotineiramente, mas no estágio de Pré-tratamento, foram encontrados valores de até 2 UE/mL após o filtro de carvão ativado.

De acordo com Hoenich (2006), o programa de controle de qualidade usado nos centros de diálises controlados pelo Instituto de Pesquisa Renal (Renal Research Institute, New York, N.Y., USA) descreveu que se o teste de LAL sensibilidade 0,06 UE/mL fosse positivo, mas negativo para sensibilidade 0,25 UE/mL, uma sanitização completa do sistema deve ser programada para breve. Entretanto, se o teste de LAL 0,25 UE/mL for positivo, a sanitização é executada imediatamente.

6.4. pH, condutividade e substâncias oxidáveis

As leituras de pH e condutividade foram realizadas nos pontos de consumo de água purificada (XI, XII e XIII) e os resultados destas medições durante todo o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2006, apresentaram médias semestrais de condutividade que variaram entre 0,8 e 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$, valores médios semestrais de pH entre 5,6 e 6,1 e resultados aprovados nos ensaios de verificação da presença de substâncias oxidáveis.

7. DISCUSSÃO

A sanitização (desinfecção) consiste em remover contaminantes e materiais incrustados no interior dos equipamentos de purificação de água e deve ser conduzido com uma frequência regular. Estes procedimentos devem ser seguidos, principalmente em estabelecimentos de saúde e indústrias de dispositivos médicos, para impedir ocorrências como a morte de 68 pacientes submetidos à hemodiálise, em abril 1996, no Instituto de Doenças Renais (Caruaru, PE, Brasil), devido à presença de toxinas de cianobactérias presentes na água usada para hemodiálise, que resultou em danos renais fatais para aqueles pacientes (COELHO, 2006).

A presença destas toxinas foi confirmada no filtro de carvão ativado usado no sistema de purificação de água daquele hospital, sugerindo que atenção especial deve ser dada a tal equipamento, incluindo freqüente sanitização ou substituição do carvão ativado por processos químicos para retirada do cloro.

Hoenich (2006) afirma que biofilmes bacterianos liberam endotoxinas na água e que estas potencialmente podem atravessar as membranas de diálise devido a seus baixos pesos moleculares (0,5 a 200 kDa). As endotoxinas transferidas aos pacientes, podem desencadear efeitos imediatos de reações pirogênicas.

Embora o sistema de purificação de água, objeto deste estudo, tenha capacidade de produção máxima de 10.000 L/dia, a demanda de água utilizada para lavagem dos componentes termoplásticos dos oxigenadores de sangue é de cerca de 3.000 L/dia. Para assegurar a pureza e qualidade da água purificada, os sistemas de purificação devem incluir a integração operacional dos equipamentos, devem ser constantemente sanitizados e sua eficiência deve ser regularmente avaliada.

A eficiência dos sistemas de purificação de água depende da correta e freqüente manutenção e reposição dos elementos filtrantes e da sanitização com produtos químicos específicos.

Este estudo avaliou a qualidade microbiológica da água através da contagem heterotrófica ($\log_{10}$ UFC/100mL, incubação a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$) das amostras coletadas em todos os estágios do processo do sistema de purificação de água.

Foram encontrados níveis máximos de 3,48 $\log_{10}$ na água de entrada (I), 3,57 $\log_{10}$ nos filtros multimeios (II), 3,75 $\log_{10}$ nos abrandadores (III), 4,97 $\log_{10}$ após o filtro de carvão ativado (VI e V), 2,53 $\log_{10}$ após a osmose reversa (VI), 2,70 $\log_{10}$ no tanque de estocagem e distribuição (VIII), 2,56 $\log_{10}$ após a lâmpada ultravioleta (IX), 2,53 $\log_{10}$ após os filtros 0,05 μm (X) e 1,98 $\log_{10}$ nos pontos de consumo (XI, XII e XIII).

Considerando o limite máximo de 4,00 $\log_{10}$ /100mL (100 UFC/mL) para a água purificada, todos os pontos desde a água de entrada apresentaram valores abaixo deste limite, exceto no leito de carvão ativado que remove o cloro da água de entrada, promovendo um ambiente propício ao aumento da carga microbiana na água.

O uso dos filtros de carvão ativado é justificado pela preservação das membranas de osmose reversa que são sensíveis aos compostos clorados. Pérez-Garcia e Rodríguez-Benítez (2000) explicam que o leito de carvão ativado que elimina o cloro, realmente promove a proliferação bacteriana e explica ainda que o tipo de meio de cultura utilizado para contagem heterotrófica e a condição de incubação têm considerável influência nos resultados.

Um estudo similar foi conduzido por Vorbeck-Meister (1999), que pesquisou a qualidade da água usada em sete enfermarias de diálise, onde observou valores

excedendo 100 UFC/mL (incubados a 22°C) em 20,0% das amostras da água de entrada, em 66,7% após a troca de iônica, em 33,3% após a osmose reversa, em 12,5% e 50,0% na água examinada na entrada e saída das máquinas de diálise, respectivamente. Usando uma temperatura de incubação de 37°C, obteve valores que excedem 100 UFC/mL somente em 10,0% das amostras de água da entrada e em 66,7% na saída das máquinas.

Comparando o desenvolvimento de biofilmes entre dois sistemas de tratamento de água (SMEETS *et al.*, 2003), um apenas com osmose reversa (centro A) e outro com osmose reversa e deionização elétrica, desinfetado continuamente por luz ultravioleta e tratado com ozônio uma vez por semana (centro B), Smeets obteve contagens acima de 100 UFC/mL em 16% das amostras incubadas a 22°C e 37°C no centro A contra 3% das amostras no centro B, somente.

Com a última sanitização realizada no sistema de purificação de água, pôde ser observada redução considerável na carga microbiana presente no filtro de carvão ativado, indicando mais uma vez, que este promove o crescimento bacteriano, devendo ter sua carga substituída em intervalos menores, esterilizados a vapor se aplicável ao equipamento, ou substituído por processo químico de retirada do cloro.

8. CONCLUSÃO

As melhorias realizadas no sistema de purificação de água, como a substituição do módulo do antigo deionizador por leitos de resina de troca aniônica e catiônica, a eliminação de pontos estagnados e a implantação de equipamentos de controle, trouxeram resultados positivos para a qualidade da água purificada, assim como trouxe a conscientização e comprometimento dos envolvidos com o processo.

O filtro de carvão ativado (IV e V) promoveu as maiores contagens microbiológicas no sistema de purificação de água, uma vez que remove o cloro da água de entrada proveniente do abastecimento público, favorecendo a proliferação bacteriana.

O filtro de carvão ativado mostrou-se incapaz de regenerar-se após repetidas sanitizações, além de liberar uma grande quantidade de partículas que impregnaram o filtro de 5µm.

A monitoração microbiológica rotineira do sistema de purificação de água e a identificação dos microrganismos resistentes são fatores chaves para a escolha dos agentes sanitizantes a serem utilizados.

O uso da lâmpada ultravioleta e dos filtros 0,05µm, contribuiu para que a água chegasse aos pontos de uso com baixos níveis microbianos, cumprindo com os limites descritos na Farmacopéia Americana (USP30, 2007).

O uso industrial da água purificada, particularmente nas indústrias médicas e farmacêuticas, requer rigoroso controle dos sistemas de purificação, armazenagem e distribuição, onde frequentemente desenvolvem-se biofilmes. Estes, acumulam bactérias, conduzindo ao risco de contaminação dos processos de manufatura, podendo consequentemente, causar injúrias aos pacientes que se submetem a procedimentos invasivos e à administração de soluções parenterais.

9. REFERÊNCIAS

- ARRUDA, E.A.G. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31(5):503-504, set-out, 1998.
- ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; KATSINAS, C.; PANGIDIS, P.; CONSTANTINIDIS, T.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; VAYONAS, G. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13: 949–954, 1998.
- ASSER, M. Obstáculos à paz: água. *BBC News*, 24 de maio de 2007. Disponível em: http://www.bbc.co.uk/portuguese/africa/news/story/2007/05/070524_middleeastwaterlv.shtml
Acessado em: 02/06/2007
- BENDIG, J.W.A.; MAYS, P.J.; EYERS, D.E.; HOLMES, B.; CHIN, T.; *Flavimonas oryzihabitans* (*Pseudomonas oryzihabitans*; CDC group Ve-2): an emerging pathogen in peritonitis related to continuous ambulatory peritoneal dialysis? *Journal of Clinical Microbiology*, 27(1): 217–218, 1989.
- BERGOGNE-BÉREZIN, E.; JOLY-GUILLOU, M.L.; Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *Journal of Hospital Infection*, 18A, 250-255, 1991.
- COELHO, S.N. A Água de Caruaru. *Medicina On Line*, 1(3), 1998. http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/agua.htm. Acessado em 01/04/2006.
- DIAS, F.N.; PENNA, T.C.V.; NOGAROTO, S.L.; MARTINS, A.M.S. A importância da Água nos Processos Industriais e Hospitalares – In: Desinfecção e Esterilização, *Atheneu*, p. 233, 2006.
- ELLIOTT, J.A.; COLLINS, M.D.; PIGOTT, N.E.; FACKLAM, R.R. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garviae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12):2731-4, 1991.
- FUNKE, G.; VON GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE, J.E 3rd; BERNARD, K. A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 125-159, 1997.
- HILLIER, S.L. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169, 455-459, 1993.
- HOENICH, N.A.; RONCO, C.; LEVIN, R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purification*, 24:11–18, 2006.

- HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; YANG, P.C.; HO, S.W.; HSIEH, W.C.; LUH, K.T. Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease*, 16, 568-574, 1997.
- IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Atlas de saneamento.
http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=119. Acessado em: 09/05/2007.
- KIM, I.S.; LEE, G.; LEE, K.J. Monitoring and characterization of bacterial contamination in a high-purity water system used for semiconductor manufacturing. *Journal of Microbiology*. 38 (2), 99-104, 2000.
- MACÊDO, J.A.B. Águas & Águas. *Conselho Regional de Química*, MG, 2004.
- LONNEMANN, G. The quality of dialysate: an integrated approach. *Kidney International*, supplement 76: S112-119, 2000.
- MALTAIS, J.B.; STERN, T. Technical report: A superior biocide for disinfecting reverse osmosis systems. *Minntech Corporation*, 2001.
- OESP, O ESTADO DE SÃO PAULO. Dia Mundial da Água, panorama de uma fonte esgotável. São Paulo, 22 de março de 2007, p. H12.
- OZAKI, H.; Li, H. Rejection of organic compounds by ultra-low pressure reverse osmosis membrane. *Water Research*, 36 (1), 123-130, 2002.
- PECES, R.; GAGO, E.; TEJADA, F.; LAURES, A.S.; ALVAREZ-GRANDE, J. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 12, 2428-2429, 1997.
- PENNA, T.C.V.; MARTINS, A.M.S.; MAZZOLA, P.G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Public Health*, 2: 13, 2002.
- PENNA, T.C.V.; MAZZOLA, P.G., MARTINS, A.M.S. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infectious Diseases*, 1:16, 2001.
- PÉREZ-GARCÍA, R.; RODRIGUEZ-BENÍTEZ, P.C. Why and how to monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15, 760-764, 2000.
- Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

- REDONDO, J.A.; LOMAX, I. Y2K generation FILMTEC RO membranes combined with new pretreatment techniques to treat raw water with high fouling potential: summary of experience. *Desalination*, 136, 287-306, 2001.
- REINA, J.; BORRELL, N. Leg abscess caused by *Weeksella zoohelcum* following a dog bite. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 1162-1163, 1992.
- ROGERS, K.; OWENS, T.; GRIFFIN, D.A.; FREY, T. Extracorporeal membrane oxygenation to cardiopulmonary bypass with a single circuit exposure. *Perfusion*, 20, 295-298, 2005.
- SAAD, M.A. Biofouling prevention in RO polymeric membrane systems. *Desalination* 88, 85-105, 1992.
- SALLES, R. K.; GOULART, R. Diagnosis of hygienic-sanitary and microbiological conditions of hospital human milk-banks. *Revista de Saúde Pública*, vol. 31, nº 2, p.131-139, 1997.
- SARMA, P.S.; MOHANTY, S. *Pediococcus acidilactici* pneumonitis and bacteremia in a pregnant woman. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2392-2393, 1998.
- SCHUL, C.; SPIEGEL, D. Seis dias de guerra, 40 anos de tensão. *Estadão*, 02 de junho de 2007.
<http://www.estadao.com.br/ultimas/mundo/noticias/2007/jun/02/129.htm>
Acessado em: 02/06/2007
- Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. Rotavírus: Importante causa de surtos de diarreia em crianças menores de 5 anos. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar-DDTHA/CVE-SES/SP, 2003.
- SEVERINO, A.J. Metodologia do trabalho científico. 22ª ed. São Paulo, Cortez, 86 p, 2002.
- SMEETS, E.; KOOMAN, J.; SANDE, F.; STOBBERINGH, E.; FREDERIK, P.; CLAESSENS, P.; GRAVE, W.; SCHOT, A.; LEUNISSEN, K. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney International*, 63:1574-1576, 2003.
- UNITED STATES FILTER CORPORATION. Operation and maintenance manual for S series reverse osmosis systems. *U.S. Filter Corporation*, 1995.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP 30), NF25 – The National Formulary. Rockville, MD, USA, 2007.
- VANCANNEYT, M.; SEGERS, P.; TORCK, U.; HOSTE, B.; BERNARDET, J.F.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K. Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 926-932, 1996.

VORBECK-MEISTER, I.; SOMMER, R.; VORBECK, F.; HÖRL, W. H. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14: 666-675, 1999.

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo.
Disponível em: www.sabesp.com.br
Acessado em 05/02/2007.

Edwards Lifesciences Corporation. Disponível em: www.edwards.com.
Acessado em 20/02/2007.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO heads UN water initiative. Disponível em:
<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2007/1000494/index.html>.
Acessado em 11/02/2007.

Museo Nazionale della Scienza e della Tecnologia. Leonardo da Vinci.
Disponível em: <http://www.museoscienza.org/leonardo/invenzioni/citta.asp>
Acessado em: 14/08/2007.

Nipro Medical Corporation. Disponível em: www.nipro.com.
Acessado em 20/02/2007.

Organização Mundial da Saúde, OMS (World Health Organization, WHO).. Water, sanitation and hygiene links to health.
Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/en.
Acessado em 18/02/2007.

Organização Mundial da Saúde, OMS (World Health Organization, WHO).
Water-related diseases. Disponível em:
http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diarrhoea/en/.
Acessado em 18/02/2007.

Organização das Nações Unidas. International Year of Sanitation (2008).
Disponível em: <http://www.un.org/esa/sustdev/sdissues/sanitation/iys.htm>.
Acessado em: 28/05/2007.

10. ANEXOS

Anexo 1. *Coloração de células pelo método de Gram*

Colocar uma pequena alçada de água destilada em uma lâmina de microscopia limpa.

Encoste a alça de inoculação (estéril ou flambada pelo bico de Bunsen) em uma colônia de bactérias, retirando-lhe uma mínima quantidade. Espalhe uniformemente esta suspensão sobre a superfície da lâmina. Deixe secar à temperatura ambiente e fixe o esfregaço na lâmina, passando-a sobre a chama do bico de Bunsen. Deixar esfriar à temperatura ambiente.

Cobrir o esfregaço da cultura em estudo (previamente fixado à lâmina de vidro) com uma solução de violeta de genciana. Deixar atuar durante 1 minuto. Todas as células ficam coradas de violeta (corante primário).

Escorrer o corante e lavar com água. Secar levemente com papel filtro.

Cobrir com lugol e deixar atuar durante 1 minuto. Escorrer a solução de lugol, lavar com água e secar.

Gotejar a solução descorante de álcool-acetona sobre a lâmina até que não saia mais corante.

Neste passo ocorre a diferenciação entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As primeiras deixam escapar a coloração violeta e as últimas a retém. As células de bactérias Gram-positivas ficam coradas de violeta-escuro e as Gram-negativas ficam praticamente incolores.

Lavar com água e secar com papel filtro.

Cobrir o esfregaço com solução de safranina e deixar atuar por 2 minutos. As células incolores de bactérias Gram-negativas ficam coradas de cor-de-rosa.

Escorrer o corante, lavar com água e retirar o excesso de água com papel filtro. Deixar secar completamente à temperatura ambiente.

Colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observar ao microscópio, com objetiva de aumento de 100x.

As células que apresentarem cor rósea (perderam a coloração violeta durante a diferenciação pelo álcool e adquiriram a cor da safranina) são Gram-negativas (Figura 28 – A).

As células que se apresentarem coradas de violeta escuro são Gram-positivas (Figura 28 – B).

O processo de coloração baseia-se, principalmente, no diferente teor lipídico da parede celular das células Gram-positivas e Gram-negativas.

Em ambos os grupos de células, o corante violeta reage com o iodo e cria um complexo cristalino que fica retido no citoplasma.

As células Gram-negativas apresentam parede celular com alto teor lipídico, que são dissolvidos pelo álcool, permitindo a saída do complexo violeta-iodo. Estas células tomam então, a cor do corante de contraste, a safranina.

Nas células Gram-positivas, a pequena quantidade de lipídios presente na parede celular é dissolvida pelo álcool, criando poros diminutos na parede celular que são fechados pela ação desidratante do álcool. Assim, o corante fica retido no interior das células.

Figura 28. (A) – Gram-negativo; (B) – Gram-positivo

Anexo 2. *Oxidase*

É um teste qualitativo utilizado para identificação de bactérias Gram-negativas não fermentadoras. A prova baseia-se na produção de uma enzima chamada indofenol oxidase. Esta enzima oxida o corante redox, presente no reativo, resultando numa mudança de cor de amarelo para púrpura escura, que é percebida visualmente após 1 minuto à adição do reagente sobre a colônia.

Anexo 3. *Indol*

É um teste qualitativo que auxilia na identificação de organismos aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos.

Este teste determina a habilidade da bactéria produzir Indol através da desaminação do aminoácido Triptofano na presença de enzimas triptofanase. Bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de degradar o triptofano com produção do indol, ácido pirúvico e amônia (NH_3).

A alteração do pH do meio contendo um indicador e a conseqüente viragem da cor indicará um teste triptofano desaminase positivo.

O Indol produzido reage com o DMACA (p-dimetilaminocinamaldeído) contido no reagente, produzindo cor do azul ao azul esverdeado.

Anexo 4. *Método gel-clot*

Transferir 100 µL da amostra a ser testada para dois tubos de reação 10x75mm em estante adequada.

Adicionar 100 µL de reagente LAL previamente reconstituído, no controle negativo, na amostra a ser testada e no controle positivo.

Vedar os tubos de reação com tampa apropriada ou filme de parafina. Agitar levemente os tubos e incubar em banho-maria estático a 37+/- 01°C por 60+/- 02 minutos. Retirar cuidadosamente, um tubo de cada vez, do banho-maria e com um movimento suave, invertê-lo a 180° e observar.

Retirar um tubo de cada vez diretamente do banho-maria e invertê-lo a aproximadamente 180° em um movimento suave. Se houve formação de um gel firme no fundo do tubo, o resultado é dado como positivo. O teste negativo se caracteriza pela ausência da formação do gel ou pela formação de uma massa viscosa que não se adere no fundo do tubo quando invertido a 180°.

Anexo 5. *Método para substâncias oxidáveis*

Em 100 mL de água, adiciona-se 10 mL de ácido sulfúrico 2 N e aquece-se até a fervura.

Adiciona-se 0,2 mL de permanganato de potássio 0,1 M que tornará uma solução cor-de-rosa. Ferve-se por 5 minutos.

A coloração cor-de-rosa da solução não deve desaparecer completamente. A perda desta coloração indica presença de substâncias oxidáveis na amostra.

SEGUNDA PARTE

Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno
e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador
de controle do processo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esterilização de artigos médicos

Para esterilização de artigos médicos, os dois métodos comumente utilizados são os processos por irradiação gama e por óxido de etileno (ETO).

O ETO é largamente utilizado para esterilização de produtos sensíveis à esterilização por calor úmido ou aqueles que são deteriorados pela radiação gama (FERRAZ *et al.*, 2002; AFFATATO *et al.*, 2003).

Os oxigenadores de membrana e os conjuntos de tubos de PVC são industrialmente submetidos à esterilização por ETO.

Os oxigenadores de membrana capilar simulam a respiração pulmonar natural através da troca de gases no sangue por uma membrana (fibra oca microporosa).

É um dispositivo essencial usado em perfusões com circulação extracorpórea nas cirurgias cardiopulmonares, devido a sua capacidade de intercambiar os gases, fazendo possíveis a adição do oxigênio e a remoção do dióxido de carbono no sangue do paciente.

O reservatório de sangue venoso com trocador de calor, armazena, filtra, rompe bolhas, esfria/aquece o sangue proveniente do paciente. O sangue flui do corpo do paciente ao oxigenador e é bombeado de volta ao paciente através de tubos de PVC conectados, com fluxos de sangue de 0,5 a 7,0 L/min.

O ETO na temperatura e na pressão ambiente é um gás incolor liquefeito a temperaturas abaixo de 10°C. No processo de esterilização, sob presença de vapor de água, se decompõe geralmente em etilenocloridrina (EC) e em etilenoglicol (EG) como resíduos secundários.

As concentrações residuais de ETO e seus derivados podem permanecer adsorvidos nas paredes dos dispositivos médicos, dependendo principalmente do tipo polimérico e do tamanho do artigo médico (LUCAS *et al.*, 2003; FURUHASHI e MIYAMAE, 1982).

ETO, EC e EG são substâncias potencialmente tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (LUCAS *et al.*, 2003; FURUHASHI e MIYAMAE, 1982; ASAKAWA *et al.*, 1993; PAGE e CYR, 2000; FOST *et al.*, 1991; ISO 14937; ISO 11134), que requerem sua remoção dos dispositivos médicos por processos de aeração, para evitar efeitos adversos em pacientes submetidos ao uso destes dispositivos, como por exemplo, nas cirurgias cardiopulmonares com circulação extracorpórea (CEC).

Para assegurar a remoção destes resíduos dos oxigenadores de membrana e dos conjuntos de tubos de PVC e assegurar que possam ser utilizados com segurança em pacientes, as análises de resíduos de ETO e seus derivados são realizadas por cromatografia gasosa (Portaria 482; ISO 10993-7).

A concentração total de ETO, EC e EG remanescente nestes dispositivos médicos foi avaliada através da extração por uso simulado do produto, método de referência recomendado, e foram comparados frente aos limites máximos permitidos pelos padrões nacionais e internacionais (Portaria 482; AAMI; ISO 11135).

O processo de esterilização por ETO foi monitorado por esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (*Bacillus subtilis* variação *niger*) como indicadores biológicos (IB) (RUTALA, 1998; USP 30, 2007) e foi também avaliado pela proteína verde fluorescente recombinante (GFP – Green Fluorescent Protein), utilizada com o propósito de ser um potencial indicador capaz de sinalizar a distribuição da penetração do gás ETO na carga a ser esterilizada.

A GFP é uma proteína globular, compacta e ácida, em forma de barril, composta de um monômero de 27 a 29 kDa, que apresenta o cromóforo situado no centro geométrico. A proteína apresenta-se estável às temperaturas de 70 °C e resistência à desnaturação química.

A GFP emite máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta (360-400 nm), apresenta pico máximo de excitação em 394 nm e pico máximo de emissão em 509 nm. A GFP expressa no citoplasma de cepas de *E. coli* (DH5- α), tem sido estudada como indicador biológico em uma variedade de aplicações como processos de esterilização e desinfecção (ISHII *et al.*, 2005).

Uma vez que a GFP exibe estabilidade às condições extremas tais como a exposição ao calor e produtos químicos denaturantes em um largo valor de pH (ISHII *et al.*, 2005; MAZZOLA *et al.*, 2006), pode ser aplicada como um potencial marcador em processos de esterilização por ETO, indicando a eficiência do processo, pela indicação da extensão da penetração do gás e sua atividade sobre os materiais, através da medida do decaimento de intensidade fluorescente remanescente após o processo (ISHII *et al.*, 2004).

1.2. Histórico sobre os oxigenadores de sangue

Os oxigenadores são dispositivos médicos utilizados em circulação extracorpórea para introduzir o oxigênio no sangue e eliminar o gás carbônico, simulando o processo de respiração natural.

O sucesso das cirurgias cardíacas, onde há a necessidade desses aparelhos, depende de um conjunto de fatores e, o avanço da tecnologia na construção de oxigenadores mais eficientes é forte aliado em benefício ao paciente.

Os primeiros oxigenadores permitiam o contato direto entre o oxigênio e o sangue. Este tipo inclui os oxigenadores de películas (telas, cilindros e discos) e os oxigenadores de bolhas. Durante muitos anos os oxigenadores de bolhas foram os mais usados em circulação extracorpórea. Estes aparelhos foram os responsáveis pela rápida expansão da cirurgia cardíaca, devido à sua relativa facilidade de construção e uso clínico (SOUZA e ELIAS, 2006).

O gás é introduzido no sangue venoso através de um dispersor que regula a transferência gasosa, pela criação de uma mistura em proporções adequadas de diversos tamanhos de bolhas. Cada uma das bolhas formadas funciona como um alvéolo independente, no qual a parede da bolha é constituída por uma lâmina de sangue. A bolha contém oxigênio no seu interior e está imersa em uma atmosfera de oxigênio.

Com a introdução dos oxigenadores de membrana, os oxigenadores de bolhas foram, progressivamente, substituídos.

Durante os processos de oxigenação e remoção de dióxido de carbono no pulmão natural, não há contato direto entre o sangue dos capilares pulmonares e o ar dos alvéolos.

O sangue e o gás estão separados pela membrana alvéolo-capilar, que é uma membrana semipermeável, ou seja, que permite a passagem dos gases de um lado para o outro, mas não permite a passagem de água ou de eletrólitos.

Ao final dos anos setenta, contudo, os progressos da tecnologia permitiram a construção de membranas do tipo “expandido” ou microporosas, de diversos materiais, principalmente o teflon e o polipropileno. A membrana microporosa tem pequenos orifícios microscópicos na sua superfície, os microporos, que são

atravessados pelas moléculas dos gases. A difusão dos gases é muito mais rápida e eficiente.

O desenvolvimento da tecnologia de produção de membranas semipermeáveis no formato de “fibras capilares” ou fibras ocas permitiu a construção de uma moderna geração de oxigenadores.

Os oxigenadores de membranas não permitem interface direta com o oxigênio. Nestes, existe uma membrana, que separa o sangue do gás utilizado para as trocas gasosas, não havendo contato direto entre ambos. Estes oxigenadores são considerados mais fisiológicos, principalmente, pela redução da interface gás-sangue.

A utilização das membranas capilares permitiu a criação de vários tipos de oxigenadores, como os oxigenadores de membranas planas (promoviam um grande seqüestro de plaquetas e seu uso foi descontinuado), os oxigenadores de membranas espiraladas (há um único modelo deste oxigenador no mercado) e os oxigenadores de membranas capilares (atualmente os mais utilizados).

Oxigenadores com membrana capilar linear, como o modelo Oxim-II-34-Ultra, foram utilizados com sucesso por vários anos até que foram substituídos pelo novo conceito de membranas dispostas em forma de esteiras duplas, em ângulo cruzado e fluxo de gases contrário ao fluxo de sangue, que reduz a área efetiva de membrana e aumenta a eficiência da troca gasosa. Isto resultou em aparelhos menores, que requerem um menor volume de “priming” (volume de preenchimento).

O oxigenador VitalTM possui o menor “priming” dentre os oxigenadores modelo adulto disponíveis no mercado atual e, com isto, permite a hemodiluição que elimina a necessidade de transfusões de sangue ao paciente.

2. OBJETIVO

Através de análises de residual de ETO e de seus produtos derivados, EC e EG, em oxigenadores de sangue e conjuntos de tubos de PVC, o objetivo deste estudo foi determinar o intervalo de tempo em que estes artigos médicos devem permanecer em sala de aeração forçada, necessário para que atinjam níveis residuais de ETO, EC e EG definidos pelas legislações vigentes, após serem esterilizados.

Tendo como finalidade avaliar a distribuição e a penetração do gás na carga a ser esterilizada, foram utilizadas amostras liofilizadas de GFP em ciclos de esterilização de 2, 4 e 8 horas, como um potencial indicador alternativo, proposto ao controle dos parâmetros de processo da esterilização, capaz de indicar a relação entre a perda na emissão de fluorescência da GFP pela exposição ao gás ETO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Oxygenadores de sangue e conjuntos de tubos de PVC*

O oxygenador de membrana capilar Vital™ (Figura 1) é um oxygenador de sangue, que possui estrutura em policarbonato e agrega diversos componentes que realizam funções vitais ao funcionamento do corpo humano, suportando a vida de pacientes quando submetidos à cirurgia de peito aberto. Possui uma área de 2 m² de membrana de fibra oca que permite a troca de gases em fluxo máximo de sangue de até 7 L/min, indicado para pacientes adultos.

Um reservatório para sangue venoso é conjugado a este dispositivo com um trocador de calor que permite aquecer ou esfriar o sangue do paciente e possui componentes que filtram e quebram bolhas de ar do sangue no circuito.

Os conjuntos de tubos de PVC (Figura 2) foram projetados para o transporte do sangue venoso extraído do doente cardíaco até o oxygenador de sangue, retornando-o como sangue arterial ao corpo do paciente, durante práticas de perfusão com circulação extracorpórea (CEC) em cirurgias cardiopulmonares.

O circuito de CEC é conectado por uma cânula venosa e uma cânula arterial onde o sangue da cânula venosa é drenado para o reservatório de sangue venoso. Um tubo ligado à uma bomba peristáltica leva o sangue venoso à câmara de oxigenação e o sangue oxigenado (arterial) retorna ao paciente pela cânula arterial.

Os conjuntos de tubos de PVC são compostos por filtro de gás, filtro de sangue arterial e tubos de PVC com medidas de: (i) 0,35m x (13mm x 1,8mm); (ii) 7,05m x (8mm x 1,6mm); (iii) 17,7m x (80,8 x 10,2mm); (iv) 2,1m x (15mm x 2,4mm) e (v) 1,04m x (13mm x 2,4mm).

O PVC é o material mais utilizado na produção de cateteres, bolsas de sangue e tubos para artigos utilizados em CEC (GRANADOS *et al.*, 2001).

Os oxigenadores de sangue e os conjuntos de tubos de PVC são manufaturados em uma Sala Limpa classe 100.000, ISO 8 (ISO 14644-1), embalados individualmente em sacos de polietileno com janelas de Tyvek® e acondicionados em caixas de papelão e assim esterilizados por ETO.

Figura 1. Oxigenador Vital™

Figura 2. Conjunto de tubos de PVC

3.2. Parâmetros do ciclo de esterilização

O processo de esterilização por ETO, foi executado usando-se uma mistura de gás esterilizante (10% ETO e 90 % CO₂) a uma concentração de 470±30 mg/L no interior da câmara esterilizadora, calculados pela relação de peso/volume do cilindro com a mistura.

$$\text{Concentração de ETO} = (P_{(\text{mg})} / C_{(\%)}) / V_{(\text{L})}$$

Onde: P= peso do gás injetado (53×10^6 mg)

C = porcentagem de ETO na mistura (10% peso/volume)

V = volume total da câmara (11,760 L)

Os parâmetros de processo foram ajustados para condicionamento em vapor ($50 \pm 5^\circ\text{C}$) e tempos de exposição ao ETO de duas horas (ciclo curto), quatro horas (ciclo médio) e oito horas (ciclo longo). O tempo de exposição ao gás, para cada produto, foi determinado a partir do valor-D, ajustado para um nível de segurança de esterilidade de 10^{-6} . O ciclo de 2 horas é destinado à esterilização dos oxigenadores de sangue, enquanto o ciclo de 4 horas corresponde à metade de um ciclo para esterilização dos conjuntos de tubos de PVC, de 8 horas de exposição ao gás ETO.

Após a exposição ao gás, os produtos permanecem em sala de aeração ($40 \pm 5^\circ\text{C}$) com ventilação forçada (26 trocas de ar por hora e máximo de 30% de umidade relativa) para dissipação dos resíduos do gás.

O ciclo de esterilização é composto por quatro etapas:

- (i) Condicionamento: O ar da câmara esterilizadora é evacuado e a pressão é reduzida de 92 kPa (ambiente) para 6 ± 2 kPa. O vapor é injetado para umidificação da carga, que eleva a pressão a 12 ± 2 kPa a uma temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$ (uma hora para carga de oxigenadores e duas horas para conjuntos de tubos de PVC).
- (ii) Exposição ao ETO: O gás ETO é injetado e pressão eleva-se de 12 ± 2 kPa para 285 ± 2 kPa a $50 \pm 5^\circ\text{C}$. O tempo do ciclo para a exposição da carga de oxigenadores é de duas horas e de oito horas para os conjuntos de tubos de PVC.
- (iii) Evacuação: Após a exposição ao ETO, a câmara é evacuada e a pressão chega a 6 ± 2 kPa. Então, ar comprimido filtrado ($0,22 \mu\text{m}$) a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ é injetado dentro da

câmara e a pressão eleva-se a 80 ± 4 kPa. Novas evacuações com injeções de ar comprimido filtrado são processadas por mais quatro vezes.

(iv) Aeração: A carga de oxigenadores esterilizados permanece por dois dias em sala de aeração e os conjuntos de tubos de PVC permanecem por oito dias na sala de aeração. Estes períodos foram estabelecidos através da curva da dissipação de resíduos de ETO.

3.3. Carga

Os ciclos de esterilização foram realizados em uma indústria de produtos cardiopulmonares (Nipro Ind. Com. Prod. Cardiopulmonares Ltda., São Paulo, SP, BR), em câmara de esterilização (Anton Pfaf Ltda, São Paulo, SP, BR) medindo 1,4x 4,2x 2,0m e volume de $11,76\text{ m}^3$, com capacidade para acomodar três páletes por ciclo de esterilização (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Câmara de esterilização

Figura 4. Pálete com carga para esterilização

3.3.1. Oxigenadores

Para os ciclos de esterilização de oxigenadores, cada pálete (1,2 x 1,2 x 1,9 m) é composto por 48 caixas (medindo 33 x 56 x 28 cm), dispostas em seis camadas com oito caixas por camada. Um ciclo de esterilização compreende três páletes que totalizam 144 oxigenadores de sangue com uma densidade igual a $0,07\text{g/cm}^3$ para cada oxigenador.

3.3.2. Conjuntos de tubos de PVC

Para os conjuntos de tubos de PVC, cada pálete (medindo 1,2 x 1,2 x 1,7 m) é carregado com 96 caixas de papelão (medindo 35,5 x 39,0 x 13,5 cm) dispostas em doze camadas com oito caixas por camada. Cada ciclo de esterilização

compreende três páletes que totalizam 288 conjuntos de tubos de PVC com uma densidade igual a $0,16 \text{ g/cm}^3$ para cada conjunto de tubos de PVC.

3.4. Indicadores biológicos

3.4.1. Esporos de *Bacillus atrophaeus*

Para monitorar os ciclos da esterilização, os esporos de *Bacillus atrophaeus* (*Bacillus subtilis* variação *niger*) ATCC 9372 (SGM Biotech, Inc., Bozeman, MT, USA) disponíveis em tiras de papel com população de $1,7 \times 10^6$ esporos foram usados como indicadores biológicos convencionais. As tiras foram distribuídas geometricamente através da câmara (dentro das caixas de papelão) cobrindo os pontos mais frios e de maior dificuldade à penetração do gás ETO (Figura 5).

Após cada ciclo de esterilização, os indicadores biológicos foram imersos em meio de cultura Trypticase Soy Broth (TSB) e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante sete dias.

O crescimento dos esporos sobreviventes é notado pela alteração de cor do meio TSB e confirmado através da transferência de da alíquota de 1mL para o meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) e incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Figura 5. Distribuição dos sensores de temperatura e umidade e indicadores biológicos na carga.

3.4.2. Proteína verde fluorescente (GFP)

Alíquotas de 1,0 mL de GFP purificada (PENNA *et al.*, 2004), na concentração de $5,44\mu\text{g. mL}^{-1}$, solubilizada em meio tamponado com pH 8,0 foi liofilizada em “vials” de vidro com tampa de rosca e septo em papel grau cirúrgico, que permite a penetração do gás e seu contato com a proteína. Os “vials” com GFP liofilizada foram embalados em embalagens Tyvek® e dispostos nos páletes com: (i) Conjuntos de tubos de PVC, em ciclos longos e ciclos médios; e (ii) Oxigenadores de sangue, em ciclos curtos. Os “vials” foram distribuídos nos mesmos pontos da câmara em que os indicadores biológicos *Bacillus atrophaeus* e os sensores de temperatura e umidade foram dispostos.

3.5. Determinação dos resíduos

As curvas de dissipação e a concentração residual de ETO, EC e EG foram determinadas com auxílio de cromatógrafo gasoso.

3.5.1. Cromatógrafo gasoso

A cromatografia gasosa (CG) é um método instrumental para a separação e identificação de compostos de produtos químicos, que permite identificar e medir a quantidade de vários componentes de uma amostra.

Um cromatógrafo gasoso modelo HP 6890 (Hewlett-Packard Company, Wilmington, DE, USA) equipado com uma coluna capilar de polietileno glicol

(HP19091N-133) medindo 30m (250 μ m x 0,25 μ m) foi usado para a análise dos resíduos de ETO, EC e EG.

O gás de arraste utilizado é o nitrogênio com taxa de fluxo constante de 1,8 mL/min. A temperatura máxima do injetor automático (1,0 μ L), é de 260°C e pressão de 18 psi. O detector de ionização de chama (FID - Flame Ionization Detector) opera a 250°C e com fluxo de gás hidrogênio de 35,0 mL/min, controlados pelo software ChemStation HP6890.

Os compostos são retidos na fase estacionária, e alcançam o detector de chama em tempos diferentes produzindo um sinal característico a cada composto. O princípio de funcionamento do detector baseia-se na geração de um sinal elétrico a partir da combustão da amostra na chama.

Um conjunto de picos (sinais) produzido é emitido pelo software ChemStation em forma gráfica em função do tempo de retenção de cada composto. A área de cada pico é relacionada à quantidade de cada componente na amostra.

3.5.2. Extração dos resíduos

Um oxigenador de cada ciclo de esterilização foi retirado imediatamente após a esterilização. Os páletes com os demais oxigenadores ficaram expostos em sala de aeração, sendo retirado um oxigenador nos intervalos de tempo descritos na Tabela 2.

Para os conjuntos de tubos de PVC, a cada ciclo de esterilização, um conjunto de tubos foi retirado após 72 horas de aeração e uma unidade retirada nos intervalos de tempo descritos na Tabela 3.

Os produtos foram retirados de posições críticas para circulação e penetração do gás no pálete (ponto 4 no pálete 1, ponto 9 no pálete 2 e ponto 15 no pálete 3) e substituídos com um produto similar para manter a configuração do pálete no intuito de evitar a criação de um fluxo de ar preferencial devido à ausência do produto retirado.

A extração por uso simulado foi realizada sobre condições que representam o maior desafio (pior caso) para a utilização do produto, conforme descrito na ISO 10993-7.

O uso simulado para oxigenadores e tubos de PVC consiste no preparo de um circuito, simulando uma cirurgia cardíaca com CEC, onde a água purificada cobre desde a entrada do sangue venoso até a saída do sangue arterial do produto. Cada produto analisado foi manuseado com equipamento de proteção individual (EPI) adequado.

Os conjuntos de tubos de PVC são conectados e formam um único circuito, enquanto os oxigenadores necessitam ser conectados por tubos que não tenham sido expostos ao ETO, para simular a passagem do sangue venoso do reservatório para a câmara de oxigenação e retorno ao paciente (Figura 6). O circuito é conectado a uma bomba peristáltica que promove uma circulação contínua de água purificada (<10 UFC/mL e condutividade $< 1,3 \mu\text{S/cm}$)(USP 30, 2007) por todo o circuito.

Após a extração, esta água foi analisada quanto à presença de resíduos de ETO, de EC e de EG.

Figura 6. Extração dos resíduos de ETO, EC e EG

O volume de água purificada utilizada na extração foi de 4,0 litros para os oxigenadores e de 2,0 litros para os conjuntos de tubos de PVC, sendo o suficiente para que o circuito fosse totalmente preenchido. A circulação de água foi mantida a temperatura de 37°C (temperatura corpórea) através de um trocador de calor. A água permaneceu em um fluxo constante de 6 L/min, bombeado por uma máquina de CEC.

Após um período de seis horas de recirculação da água em um circuito fechado, esta água (extrato) foi retirada dos produtos e analisada quanto aos resíduos de ETO, EC e EG por cromatografia gasosa.

3.5.3. Curvas padrões

Para determinar a curva de calibração do cromatógrafo foram utilizados os padrões de ETO (Solutech, São Paulo, SP, Brazil), EC (Sigma, Saint Louis, MO, USA) nas concentrações de 5,0 µg/mL, 25,0 µg/mL e 50,0 µg/mL e padrões de EG

(Sigma, Saint Louis, MO, USA) nas concentrações de 50 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL.

Cada um dos padrões de ETO foram injetados duas vezes e o desvio padrão relativo da curva padrão não excedeu 5% para ETO e EC e 10% para EG no intervalo dos padrões usados e o quadrado do coeficiente de correlação (r) superiores a 0,99, calculados pela equação $y=mx+b$, onde y corresponde à área do pico e x a concentração dos padrões que tiveram os resultados calculados pelo software ChemStation, representadas pelas curvas de calibração (Figura 7 - A, B e C).

Figura 7 – A. Curva de calibração padrão ETO

Figura 7 – B. Curva de calibração padrão EC

Figura 7 – C. Curva de calibração padrão EG

3.5.4. Níveis de concentração residual

Os níveis de resíduos foram determinados a partir da concentração ($\mu\text{g/mL}$) indicada pelo software Chemstation HP6890, multiplicada pelo volume do extrato total (2000mL e 4000mL para os oxigenadores e tubos de PVC, respectivamente), dividida por 1000 $\mu\text{g/g}$ (para resultados em mg) ou dividida pelo peso da amostra (para os resultados em ppm) (NOGAROTO e PENNA, 2006) como segue:

$$\text{Nível de resíduo (mg)} = (\text{Concentração}_{(\mu\text{g/mL})} * \text{Volume}_{(\text{mL})} / 1000_{(\mu\text{g/g})})$$

$$\text{Nível de resíduo (ppm)} = (\text{Concentração}_{(\mu\text{g/mL})} * \text{Volume}_{(\text{mL})} / \text{Peso da amostra}_{(\text{g})})$$

Onde:

Concentração residual ($\mu\text{g/mL}$) = Valor calculado pelo ChemStation HP6890

Volume (mL) = Volume total utilizado na extração por uso simulado

Peso da amostra (g) = Peso de cada oxigenador ou conjunto de tubos

As amostras foram pesadas em balança semi-analítica modelo AS2000 (Marte, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil). O peso dos oxigenadores de membrana foi de $1694,45 \pm 87,10$ g e dos conjuntos de tubos de PVC foi de $1714,38 \pm 14,96$ g.

3.6. Limites máximos de resíduos de ETO, EC e EG

Os resultados obtidos foram comparados com os limites máximos de resíduos em oxigenadores de sangue e conjuntos de tubos de PVC estabelecidos:

Portaria Interministerial 482 – (i) $ETO \leq 25$ ppm, (ii) $EC \leq 25$ ppm, (iii) $EG \leq 250$ ppm.

ISO 10993-7 – (i) $ETO \leq 60$ mg, (ii) $EC \leq 12$ mg, (iii) EG não é aplicável.

De acordo com a ISO 10993-7, não há necessidade de expressar resultados de EG, pois quando os limites de ETO e EC são devidamente controlados, não há riscos de haver resíduos de EG biologicamente significantes para o paciente.

Enquanto a ISO 10993-7 estabelece limites com base na quantidade total de resíduos de ETO em cada dispositivo médico, como a média de dose diária ao paciente, independente do peso ou tamanho do dispositivo, para a legislação brasileira, o peso do produto é um fator importante, pois a concentração (em ppm) dos resíduos de ETO pode diminuir quando o peso do dispositivo aumenta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três ciclos da esterilização foram executados de acordo com os parâmetros de temperatura, umidade e pressão pré-estabelecidas (Figuras 8, 9 e 10), com 2, 4 e 8 horas de exposição à mistura gasosa esterilizante, que compreendem ciclos de esterilização para oxigenadores, meio ciclo (de tubos de PVC) e ciclo para tubos de PVC.

O tempo de exposição ao gás, para cada produto, foi determinado a partir do valor-D, ajustado para um nível de segurança de esterilidade de 10^{-6} .

A avaliação com a câmara cheia indicou que as áreas mais frias coincidem com o centro geométrico dos páletes e próximos às portas da câmara esterilizadora: (i) 44,26 ($\pm 1,10$) °C para ciclo de 2 h, (ii) 44,64 ($\pm 1,32$) °C para ciclo de 4 h; (iii) 43,69 ($\pm 2,19$) °C para ciclo de 8 h.

Após a injeção de ETO, durante o período de exposição, a temperatura e umidade relativa na câmara, sob uma pressão de 285 (± 2) kPa, variou entre (i) 44,26 ($\pm 1,10$) °C e 51,91 ($\pm 1,41$) °C e umidade relativa de 58,45 ($\pm 13,28$) % e 91,90 ($\pm 8,34$)% para o ciclo de 2 h; (ii) 48,44 ($\pm 1,46$)°C e 50,28 ($\pm 0,70$)°C e umidade relativa de 58,20 ($\pm 13,24$) % e 99,51($\pm 4,63$) % para o ciclo de 4 h e 45,33 ($\pm 1,78$) °C e 49,07 ($\pm 1,12$)°C com umidade relativa entre 87,36 ($\pm 6,67$)% e 95,51 ($\pm 3,16$)% para ciclo de 8 h.

Figura 8. Parâmetros de temperatura, umidade e pressão para ciclo de 2 horas.

Figura 9. Parâmetros de temperatura, umidade e pressão para ciclo de 4 horas

Figura 10. Parâmetros de temperatura, umidade e pressão para ciclo de 8 horas

4.1. Concentração de GFP

A concentração inicial de GFP era de 5,44µg/mL em cada vial. Após o processo de esterilização, a proteína liofilizada foi re-hidratada em água estéril e a concentração remanescente foi quantificada por espectrofluorímetro (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e comparadas com a concentração inicial não exposta ao ETO. As concentrações de GFP remanescentes após 2, 4 e 8 horas de exposição à mistura esterilizante são apresentadas na Tabela 1 e Figura 11.

Duas horas de exposição da GFP ao gás ETO, mostrou decaimento da concentração de GFP que variou de 0,17% no ponto 17 a 10,19% no ponto 10. Nesta configuração, o processo não resultou na deterioração da concentração de GFP nos pontos 4, 6, 8, 14 e 16. O decaimento médio da concentração de GFP foi de 2,88% e 1,73% para os páletes 1 e 3 respectivamente, e 5,95% no pálete 2.

Quatro horas de exposição à mistura do gás esterilizante em meio ciclo de esterilização de conjuntos de tubos de PVC reduziram a concentração inicial da GFP em todos os pontos monitorados na câmara esterilizadora que variaram de 8,69% a 29,62%, respectivamente nos pontos 14 e 11 da câmara.

O ciclo de 8 horas de exposição permitiu o máximo decaimento (entre 22,49% e 23,89%) na concentração de GFP oposto ao máximo decaimento (entre 1,73% e 5,95%) encontrado no ciclo de 2 horas de exposição, indicando que a intensidade de fluorescência da proteína é estável ao ETO.

Um período de 2 horas da exposição ao ETO forneceu um declínio médio na concentração de GFP de 1,73%.

A exposição da GFP ao ETO por um período de 8 horas permitiu maior uniformidade das condições internas da câmara, apresentando redução da

concentração de GFP similar nos três páletes, sendo a redução média de 23,52%, 22,49% e 23,89% para os páletes 1, 2 e 3, respectivamente.

A maior perda de concentração da GFP foi no centro da câmara de esterilização, correspondente ao pálete 2, nos pontos 10 e 11 (parte superior do pálete), próximo ao misturador de ar da câmara. Coincidentemente, a distribuição de ETO é de forma tal que a maior concentração de GFP foi verificada no centro da carga e as menores na superfície externa da carga, indicadas pela redução de fluorescência da GFP.

Os esporos de *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372), utilizados nos ciclos de esterilização foram incubados a $36\pm1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias e não apresentaram crescimento.

Tabela 1. Concentração de GFP remanescente após o processo de esterilização por ETO.

		Concentração inicial (5,44 µg/mL)					
		2 horas		4 horas		8 horas	
		Concentração (µg/mL)	Perda (%)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)	Concentração (µg/mL)	Perda (%)
pálete 1	1	5,26	3,41	4,45	18,23	4,39	19,45
	2	5,17	5,08	4,20	22,87	4,56	16,34
	3	5,20	4,51	4,62	15,26	4,07	25,32
	4	5,48	-0,54	4,57	16,05	4,06	25,48
	5	5,05	7,33	4,66	14,38	4,04	25,78
	6	5,59	-2,53	4,48	17,79	3,88	28,74
	Média		2,88		17,43		23,52
pálete 2	7	5,22	4,19	4,57	16,09	4,24	22,12
	8	5,46	-0,15	4,49	17,53	4,19	23,02
	9	5,03	7,72	4,57	16,09	4,46	18,04
	10	4,89	10,19	3,90	28,34	4,23	22,29
	11	5,02	7,81	3,83	29,62	3,98	26,98
	Média		5,95		21,53		22,49
Pálete 3	12	5,06	7,22	4,38	19,62	4,34	20,28
	13	5,15	5,41	4,07	25,26	4,34	20,30
	14	5,85	-7,33	4,97	8,69	4,30	21,06
	15	5,11	6,29	4,83	11,39	3,85	29,41
	16	5,52	-1,40	4,45	18,25	4,09	24,90
	17	5,44	0,17	4,13	24,19	3,96	27,38
	Média		1,73		17,90		23,89

Figura 11. Concentração de GFP remanescente após o processo de esterilização por ETO.

4.2. Dissipação do gás ETO

Três ciclos de esterilização foram processados para cada linha de produto. Para o oxigenador Vital™, seis amostras foram analisadas totalizando 18 amostras e para os conjuntos de tubos de PVC, nove unidades foram analisadas no primeiro e terceiro ciclos e seis unidades no segundo ciclo, totalizando 24 amostras analisadas.

O nível de resíduo de cada amostra analisada (oxigenador e conjunto de tubos de PVC) foi calculado em ppm e mg como descrito nas Tabelas 2 e 3, para atender às normas nacionais e internacionais.

A partir dos resultados obtidos, as curvas lineares de dissipação foram feitas com base nos limites estabelecidos para oxigenadores de sangue e conjuntos de tubos de PVC, determinando o tempo de retenção necessário em sala de aeração forçada.

Tabela 2. Dissipação dos resíduos em oxigenadores Vital™.

Ciclo de esterilização	Tempo de aeração (h)	Resíduo de ETO (ppm)	Resíduo de ETO (mg)
1	0	22,99	37,48
	2	16,19	26,65
	4	12,51	20,49
	10	10,63	17,33
	14	11,83	19,30
	16	11,72	19,25
2	0	23,77	38,72
	2	18,78	35,30
	4	17,19	31,85
	10	13,54	23,69
	14	13,69	24,68
	16	10,93	19,47
3	0	17,89	30,16
	2	15,79	25,68
	4	14,61	23,82
	10	13,47	23,77
	14	10,67	17,10
	16	8,66	14,52

Tabela 3. Dissipação dos resíduos em conjuntos de tubos de PVC

Ciclo de esterilização	Tempo de aeração (h)	Resíduo de ETO (ppm)	Resíduo de ETO (mg)
1	72	221,47	374,38
	96	129,99	223,87
	120	65,37	111,91
	168	21,71	37,00
	192	21,62	36,99
	216	20,82	35,49
	240	9,79	16,72
	264	19,00	32,46
	288	7,79	13,28
2	72	125,46	215,87
	122	54,44	93,53
	194	13,86	23,91
	240	5,42	9,35
	264	6,08	10,46
	286	2,69	4,64
3	72	151,48	259,19
	100	138,85	234,54
	120	83,00	142,06
	143	57,24	97,78
	168	20,97	36,97
	192	20,22	34,61
	216	3,07	5,22
	240	6,35	10,97
	264	6,43	11,08

A quantidade máxima residual de ETO nos oxigenadores de sangue logo após o processo de esterilização foi de 24,12 ppm e 38,42 mg, isto é, inferiores aos limites estabelecidos pela legislação vigente.

De acordo com as curvas da dissipação de ETO, os oxigenadores Vital™ não necessitam de aeração forçada após a esterilização (Figura 12). Os níveis residuais de EC e EG não excederam os limites máximos estabelecidos desde a primeira amostra analisada, de forma que não foi necessário fazer a regressão linear da dissipação destes resíduos.

Figura 12. Dissipação de resíduos de ETO em oxigenadores Vital™

Entretanto, observa-se que após 16 horas de permanência na sala de aeração, a concentração máxima de ETO foi de 11,72 ppm e 19,47 mg (Tabela 2).

Enquanto aguardam o resultado dos indicadores biológicos *B. atrophaeus*, a carga de oxigenadores permanece por dois dias em sala de aeração e são então liberados com níveis ainda mais baixos de ETO.

Nos conjuntos de tubos de PVC, de acordo com a Tabela 3, as primeiras amostras de cada ciclo de esterilização foram analisadas após 72 horas de aeração, tendo sido encontrados valores máximos de residual de ETO de 222 ppm e 488 mg.

Para alcançar os limites de residual estabelecidos pelas normas vigentes, a regressão linear expressa pelo gráfico (Figura 13) mostra que são necessárias 216 horas de permanência na sala de aeração. Após este período, 21 ppm e 46,2 mg de residual de ETO foram alcançados, sendo valores abaixo do recomendado.

Figura 13. Dissipação de resíduos de ETO em Conjuntos de tubos de PVC

Os produtos esterilizados por ETO geralmente requerem aeração por 15 dias ou mais, quando se trata de dispositivos médicos, dependendo do polímero do dispositivo (VINK e PLEJSIER, 1986).

Estudos sobre resíduos de ETO em polímeros demonstram que polímeros com características vítreas (como o policarbonato) retêm menores quantidades e que materiais porosos (como o PVC) tendem a reter maiores quantidades de ETO devido a baixos coeficientes de difusão (LUCAS *et al.*, 2003).

O ETO é prontamente adsorvido por muitos polímeros, mas não se dissipa facilmente, mesmo em aeração forçada (GRANADOS *et al.*, 2001). Entretanto, com a melhoria e o controle dos processos de esterilização por ETO e o uso da aeração forçada com ventilação e temperatura adequada, os níveis aceitáveis de residual de ETO e seus derivados são alcançados mais rapidamente.

A permanência dos produtos esterilizados em aeração por longos períodos, faz com que os fabricantes acumulem grandes estoques para suprir o mercado, acarretando custos.

A otimização do processo de aeração permite que o produto seja liberado para venda mais rapidamente, diminuindo o armazenamento de estoques, o que gera economia e preços mais competitivos ao produto.

Enquanto o oxigenador Vital™ alcança os limites máximos de residual de ETO permitidos assim que o ciclo de esterilização termina, seu modelo predecessor não mais fabricado, o oxigenador Oxim-II-34 Ultra, exigia 29 horas de aeração para alcançar tais limites (Figura 14).

Isto pode ser explicado pelo desenho diferenciado e material de construção de cada oxigenador, conforme comparado na Quadro 1.

Figura 14. Dissipação de resíduos de ETO em oxigenadores Oxim-II-34 Ultra

Quadro 1. Especificação técnica dos oxigenadores.

Oxigenador Vital™	
Corpo	Policarbonato
Tipo de membrana	Membrana capilar oca (esteira)
Material da membrana	Polipropileno
Área da membrana	2m ²
Volume de priming inicial	180mL
Oxigenador Oxim-II-34 Ultra (modelo antecessor)	
Corpo	Polimetilmetacrilato (Acrílico)
Tipo de membrana	Membrana capilar oca (linear)
Material da membrana	Polipropileno
Área da membrana	2,1m ²
Volume de priming inicial	480mL

A diferença na dissipação do resíduo de ETO entre cada produto analisado pode ser relacionada aos materiais usados em cada produto. Os tubos de PVC têm uma área de superfície e capacidade maior de absorção de ETO em relação aos oxigenadores de policarbonato e acrílico.

5. CONCLUSÃO

O desempenho físico do processo de esterilização, associado ao monitoramento com *Bacillus atrophaeus* e a proteína verde fluorescente (GFP), mostrou-se adequado para os parâmetros de distribuição do calor, umidade e concentração do gás na carga, controlando o processo.

A GFP liofilizada mostra sua potencialidade como biossensor da penetração do gás e sua distribuição por entre os dispositivos médicos em processo de esterilização, indicando diferenças na ação do gás dentro da câmara e sobre os dispositivos médicos. O decaimento de sua concentração é proporcional ao tempo de exposição ao gás.

O uso da GFP apresenta vantagens frente ao uso de indicadores biológicos convencionais, pois seu tempo de resposta é menor e possibilita correlacionar a quantidade de fluorescência remanescente com a quantidade de agente esterilizante à que foi exposta.

O oxigenador em policarbonato apresentou menor afinidade em reter resíduos de ETO do que os tubos de PVC.

O ETO adsorvido nas paredes dos artigos em PVC levam à uma permanência maior destes produtos em sala de aeração forçada, fazendo disto, um desafio para os processos de esterilização por óxido do etileno.

O controle de processo e dos resíduos após a esterilização dos oxigenadores e dos conjuntos de tubos de PVC é extremamente importante, devido ao seu contato com o sangue e órgãos vitais de pacientes, podendo aumentar a possibilidade de contaminação por transferência dos resíduos aos pacientes, causando-lhes danos irreparáveis.

6. REFERÊNCIAS

- AAMI TIR N° 19. Guidance for ANSI/AAMI/ISO 10993-7:1995, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 7: Ethylene Oxide Sterilization Residuals, 1998.
- AFFATATO, S.; BERSAGLIA, G.; EMILIANI, D.; FOLTRAN, I.; TADDEI, P.; REGGIANI, M.; FERRIERI, P.; TONI, A. The performance of gamma- and EtO-sterilised UHMWPE acetabular cups tested under severe simulator conditions. Part 2: wear particle characteristics with isolation protocols. *Biomaterials*. 24: 4045-4055, 2003.
- ASAKAWA, F.; Jitsunari, F.; Suna, S.; Manabe, Y.; Fukunaga, I.; Takeda, N. Measurement of ethylene oxide at a medical sterilization site. *Japanese Journal of Industrial Health*. 35(5):413-8, 1993.
- FERRAZ, C.A.M.; PENNA, T.C.V.; PEREIRA, E.P.; TAQUEDA, M. E. Ethylene oxide sterilization of surgical sutures monitored by *Bacillus subtilis*. *Zentral Sterilization*. 10 (1):24-37, 2002.
- FOST, U.; HAILLIER, E.; OTTENWALDER, H.; BOLT, H.M.; PETER, H. Distribution of ethylene oxide in human blood and its implications for biomonitoring. *Human & Experimental Toxicology*. 10:25-31, 1991.
- FURUHASHI, M.; MIYAMAE, T. Ethylene oxide sterilization of medical devices with special reference to the sporicidal activity and residual concentration of ethylene oxide and its secondary products. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*. 29(2):23-35, 1982.
- GRANADOS, D.L.; JIMÉNEZ, A.; CUADRADO, T.R. Assessment of parameters associated to the risk of PVC catheter reuse. *Mater Res (Appl Biomater)* 58: 505-510, 2001.
- ISHII, M.; KUNIMURA, J.S.; CHAU, E.; PENNA, T.C.V. Green fluorescent protein (GFPuv) stability in glucose solutions at room temperature. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 40, supl. 1, 2004.
- ISHII, M.; PENNA, T.C.V.; KUNIMURA, J.S.; CHOLEWA, O. Stability of Recombinant Green Fluorescent Protein (GFPuv) in Glucose Solutions at Different Concentrations and pH values. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 121-24, p. 501-527, 2005.
- ISO 10993-7 – International Standard: *Biological evaluation of medical devices, part 7 – Ethylene oxide sterilization residuals*, 1996.
- ISO 11134 – International Standard: *Sterilization of Health Care Products - Requirements for Validation and Routine Control - Industrial Moist Heat Sterilization*, 1994.

- ISO 11135 – International Standard: Medical Devices-Validation and Routine Control of Ethylene Oxide Sterilization, 1994.
- ISO 14644-1 – International Standard: Cleanrooms and associated controlled environments–Part 1: Classification of air Cleanliness, 1999.
- ISO 14937 – International Standard: Sterilization of Health Care Products - General Requirements for Characterization of a Sterilizing Agent and the Development, Validation and Routine Control of a Sterilization Process for Medical Devices, 2000.
- LUCAS, A.D.; MERRITT, K.; VICTORIA, M. H.; WOODS, T.O.; McNAMEE, S.G.; LYLE, D.B.; BROWN, S.A. Residual ethylene oxide in medical devices and device material. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 66B, Issue 2, Pages 548 – 552, 2003.
- MAZZOLA, P.G.; ISHII, M.; CHAU, E.; CHOLEWA, O.; PENNA, T.C.V. Stability of Green Fluorescent Protein (GFP) in Chlorine Solutions of Varying pH. *Biotechnology Progress*, v. 22, p. 1702-1707, 2006.
- NOGAROTO, S.L.; PENNA, T.C.V. Desinfecção e Esterilização. *Atheneu*, São Paulo, 2006.
- PAGE, B.F.J.; CYR, W.H. “A Guide to ISO 10993-7 and AAMI TIR 19 for ETO-Sterilized Devices”. *Medical Device & Diagnostic Industry*, 2000.
- PENNA, T.C.V.; ISHII, M.; SOUZA, L.C.; CHOLEWA, O. Expression of green fluorescent protein (GFP) in *Escherichia coli* DH5- α , under different growth conditions. *African Journal of Biotechnology* vol. 3, nº 1, pp. 105-111, 2004
- PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 482 de 16 de abril de 1999. D.O.U. de 19/04/99.
- RUTALA, W. A. Desinfection Sterilization and Antisepsis in Health Care. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, Inc. Washington, D.C. USA, and Polyscience Publications, Inc. Champlain, N.Y. USA, 1998.
- SEVERINO, A.J. Metodologia do trabalho científico. 22ª ed. São Paulo, Cortez, 2002. 86 p.
- SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. Fundamentos da Circulação Extracorpórea. 2ª edição, Alfa Rio, RJ, 2006.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP 30), NF25 – The National Formulary. Rockville, MD, USA, 2007.
- VINK, P.; PLEIJSIER, K. Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers. *Biomaterials*, 1986.

Anexo 01 – Informação para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo 02 – declaração de Dispensa de Análise do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA

São Paulo, 09 de Abril de 2007.

Eu, **Fábio Nunes Dias**, número USP 5507251, matriculado no curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, juntamente com minha orientadora, **Profª Dra. Thereza Christina Vessoni Penna**, declaramos para os devidos fins, que o Projeto de Mestrado intitulado “*Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo*” dispensou análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta instituição, em razão de todos os ensaios terem sido realizados por meio “in vitro”, não envolvendo humanos ou animais.

Atenciosamente,

Fábio Nunes Dias
Mestrando

Profª Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
Orientadora