UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Loraine Carolina Goenaga Mafud

Estudo de viabilidade para descontaminação de rim para transplante utilizando líquido circulante

São Carlos

2021

## Loraine Carolina Goenaga Mafud

## Estudo de viabilidade para descontaminação de rim para transplante utilizando líquido circulante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do titulo de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Versão Corrigida (versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

> São Carlos 2021

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

> Goenaga Mafud, Loraine Carolina Estudo de viabilidade para descontaminação de rim para transplante utilizando líquido circulante / Loraine Carolina Goenaga Mafud; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2021. 82 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

 Radiação ultravioleta-C. 2. Descontaminação de rim.
 Inativação microbiana. 4. Custodiol®. 5. Transplante renal. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient. II. Título.

Dedico este trabajo a toda mi familia, amigos que hicieron parte de este proceso de alguna manera y en especial a mi madre y mi abuela que siempre han sido un apoyo en mi vida. ¡Ojalá pudieran ser eternas!

## AGRADECIMENTOS

Primero quiero agradecerle a Dios por la oportunidad de vida, por guiarme a escoger este camino, bendiciéndome cada día, iluminándome y dándome fortaleza.

A mi madre Lidia, que siempre estuvo apoyándome en mis decisiones, luchando fuertemente para que sea la persona que soy hoy. A ti madre, que has sido mi mejor amiga incondicional.

A mi abuela, Cenith, que ha sido mi segunda madre, mi compañera desde que tengo memoria, luchadora y consentidora. Después de mi madre, has sido siempre tu la persona que nos cuidas como tus propios hijos.

A mi hermano Junior y mi padrastro Fredy, que han sido incondicionales, sin duda alguna, una pieza fundamental en mi vida.

A mi tía Venus, que ha sido otra madre incondicional, que me ha ayudado y apoyado cuando lo necesito, siempre dispuesta para mí.

A mi familia, conformada por mi tío Miguel, Kelly, mi tío Fredy, mis primas, Lorena, Valeria, Lina, Andrea, Gabriela y Milagros que han sido un apoyo emocional fundamental en este lindo camino escogido.

Al profesor Vanderlei, por ser mi orientador, darme la oportunidad de hacer parte de este maravilloso grupo y ofrecerme este trabajo excelente.

A el grandioso grupo de descontaminación de órganos, profesora Cristina, Didi, Natalia, Yordania, Carolina y Tulio que han sido muy importante para la realización de esta etapa de mi vida, me han guiado, orientado, brindado paciencia y cariño, gracias por este lindo trabajo.

A mis amigos del grupo "Chiquitos": Paola, Carlos, Rayson, Beder, Jenny, Daya y German, que son como mis hermanos y que cada día me hacen sentir que no estoy lejos.

A mis amigas las "superpoderosas" Yordania, Erika y Stephanny y Mojojo Johan, que han sido mi familia lejos de casa, los mejores colegas del mundo.

A Leandro, Lourdes y Lorisvaldo, mi nueva familia, que cuidan de mí, me brindan su amor, comprensión y sin duda, han sido importantes en este nuevo camino de mi vida. A el Laboratorio de Apoyo Técnico da USP (LAT, Instituto de Física de São Carlos -Universidade de São Paulo), en especial a Vinicius e Daniel por el desarrollo de los equipos de descontaminación, utilizados en este trabajo.

A la empresa "Organ Recovery Systems" por el préstamo de la máquina de perfusión de riñón "Lifeport Kidney Transporter", para llevar a cabo los experimentos.

A todos los colegas de Biofotónica, el mejor grupo que he conocido.

A las agencias de fomento de Brasil, FAFQ, CAPES, CNPq, FAPESP, en especial CAPES que me apoyó con el financiamiento de mi trabajo de maestría.

Al IFSC-USP por su gran contribución en mi Carrera profesional.

A São Carlos, Brasil, por ser una ciudad acogedora.

"O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se."

#### RESUMO

GOENAGA MAFUD, L. C. Estudo de viabilidade para descontaminação de rim para transplante utilizando líquido circulante. 2021. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Transplantes de órgãos é um tema de grande relevância em diversos aspectos. Há uma crescente demanda de centros especializados em fazê-los, porém não há suficientes doadores disponíveis. Os órgãos de pacientes com infecções onde os antibióticos não são sificientes no tratamento, são descartáveis, diminuindo ainda mais a disponibilidade. Por outro lado, os patógenos que ali estão, podem causar problemas para o receptor devido a baixa imunidade necessária de ser induzida para evitar rejeição. Se tivermos um sistema e procedimentos para diminuir a carga de microrganismos de um órgão a ser transplantado, ganhamos nas duas frentes: aumenta-se a disponibilidade de órgãos e melhora-se o resultado dos transplantes. Neste trabalho estamos demonstrando a viabilidade de podermos diminuir a carga microbiológica de rins para transplante utilizando técnicas fotônicas, com ausência de produtos químicos que podem levar a outras complicações. Utilizando a técnica de utilização de ultravioleta-C como agente físico em líquidos circulantes, pretendemos demonstrar a viabilidade de descontaminar rins, durante a fase de perfusão do órgão, fato que ocorre logo após a remoção do doador, antes do receptor. Para isto utilizamos um sistema de iluminação de UV-C em líquidos circulantes com distribuição de luz perimetral, desenvolvido em nosso grupo. Começamos com a demonstração que somos capazes de diminuir a carga microbiológica do líquido de perfusão durante sua circulação. Utilizando S. aureus como modelo, fomos capazes de demonstrar que em menos de 40 min de circulação e iluminação, eliminamos a carga bacteriana do perfusado (5 log (UFC/mL)), composto de custodiol comercial. Observa-se que a diminuição microbiana é acentuada sem comprometer a integridade do perfusado ele mesmo. Em seguida, criamos um modelo para verificar a possibilidade de diminuição, quando um tipo de órgão (modelo experimental renal) está presente no circuito, liberando de forma diferente uma certa taxa de microrganismos, à medida que se elimina na solução. O

resultado demonstra que eliminamos mais rápido do que se libera. Finalmente, utilizamos um modelo *ex-vivo* com rim de porco, circulando em uma máquina do tipo Lifeport, para demonstrar que podemos contaminar o órgão e em seguida promover a eliminação da carga microbiológica. Os resultados mostram grande viabilidade da técnica, porém com a necessidade de acelerar a capacidade do líquido circulante remover os microrganismos do órgão. Indicativos de uso de ultrassom e controle de temperatura, podem ser soluções a serem testadas no futuro.

**Palavras-chave:** Radiação Ultravioleta-C. Descontaminação de rim. Inativação microbiana. Custodiol<sup>®</sup>. Transplante renal.

#### ABSTRACT

GOENAGA MAFUD, L. C. Viability study for kidney decontamination for transplantation using circulating liquid. 2021. 82p. Dissertation (Master in Science) – São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

Organ transplants are a topic of great relevance in several aspects. There is a growing demand of specialized centers to do this, but there are not enough donors available. The organs of patients with infections where antibiotics are not sufficient in the treatment are disposable, further reducing availability of organs. On the other hand, the pathogens that are there can cause problems for the recipient due to the low immunity needed to be induced to avoid rejection. If we have a system and procedures to reduce the load of microorganisms from an organ to be transplanted, we win on both fronts: the availability of organs is increased and the overall success of transplants is improved. In this work we are demonstrating the feasibility of being able to reduce the microbiological load of kidneys for transplantation using photonic techniques, with the absence of chemicals that can lead to other complications. Using the technique of Ultraviolet-C as a physical agent in circulating liquids, we intend to demonstrate the feasibility of decreasing the microbial load in kidneys, during the organ perfusion phase, a fact that occurs right after the donor removal, before the recipient. For this we use a UVC lighting system in circulating liquids with perimetric light distribution, developed in our group. We started with the demonstration that we are able to decrease the microbiological load of the perfusion liquid during its circulation. Using S. aureus as a model, we were able to demonstrate that in less than 40 min of circulation and lighting, we eliminated the bacterial load of the perfusate (5 log (CFU/mL)), composed of commercial custodial. It is observed that the microbial decrease is accentuated without compromising the integrity of the perfusate itself. Then, we created a model to verify the possibility of decrease, when a type of organ (renal experimental model) is present in the circuit, releasing differently a certain rate of microorganisms, while the procedure is applied to the solution. The result shows that we eliminate faster than we release, living accumulated microorganisms in the reservoir. Finally, we use an ex-vivo model with pig kidney, circulating in a Lifeport machine, to demonstrate that we can contaminate

the organ and then promote the elimination of the microbiological load. The results show great feasibility of the technique, but with the need to accelerate the ability of the circulating liquid to remove microorganisms from the organ. Indications of the use of ultrasound and temperature control, may be solutions to be tested in the future. **Keywords:** Ultraviolet-C radiation. Kidney decontamination. Microbial inactivation. Custodiol®. Kidney transplantation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos rins27
Figura 2 -	Partes da LifePort® Kidney Transporter29
Figura 3 -	Espectro eletromagnético de luz ultravioleta32
Figura 4 -	Mecanismo de ação da UV-C33
Figura 5 -	Letalidade dos comprimentos de ondas UV33
Figura 6 -	Geometria das lâmpadas e tubo de quartzo40
Figura 7-	Esquema para sistema de descontaminação UV-C. a) A solução a ser descontaminada foi mantida em reservatório, Circuito de perfusão (Cassete). b) do reservatório, a solução é bombeada através do circuito, c) onde é irradiada pela fonte de luz UV-C e envia enviada de volta ao reservatório através do rim. A fonte de luz UV-C (c, d) é composta por quatro lâmpadas que irradiam um tubo de quartzo (e) por onde flui a solução de preservação, que pode ser vista pela vista lateral (f)
Figura 8 -	a) Contagem de bactérias de placas Petri dos grupos irradiados com luz UV-C e b) placas do grupo controle43
Figura 9 -	Quantidade de log (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> recuperados em 4 horas. Em vermelho <i>S. aureus</i> irradiada com UV-C e em preto o controle sem irradiação
Figura 10 -	Quantidades médias de <i>S. aureus</i> coletadas em 30 minutos. Em vermelho <i>S. aureus</i> irradiada com UV-C e em preto o controle47
Figura 11 -	Espectro de absorbância do Custodiol® irradiado utilizado durante a 4h de circulação do líquido pelo sistema50
Figura 12 -	Citotoxicidade do líquido de preservação (Custodiol <sup>®</sup> HTK) em fibroblastos durante 4 h de circulação do líquido pelo sistema51
Figura 13 -	Sistema de descontaminação por luz UV-C. a) modelo experimental para simular o rim, b) fonte de luz UV-C, c) bomba peristáltica
Figura 14 -	Metodologia em função do tempo do experimento55
Figura 15 -	• A inibição do crescimento de S. aureus com 4 h de radiação UV-C. Temperatura ambiente (T.Am.) em preto, temperatura baixa (T.B.) em vermelho e Temperatura alta (T.A.) em cinza

Figura 16 - In To (1 To ar (1	nibição do crescimento de <i>S. aureus</i> na amostra após ultrassom. Temperatura Alta controle (T.A.C) e Temperatura alta irradiada T.A.I) na cor preta; Temperatura baixa controle (T.B.C) e Temperatura baixa irradiada (T.B.I) em cinza Temperatura mbiente controle (T.Am.C) e Temperatura ambiente irradiada T.Am.I) em vermelho	7
Figura 17 - In es irr To ar (T	nibição do crescimento de <i>S. aureus</i> na amostra após Swab na sponja. Temperatura Alta controle (T.A.C) e Temperatura alta radiada (T.A.I) na cor preta; Temperatura baixa controle (T.B.C) e remperatura baixa irradiada (T.B.I) em cinza Temperatura mbiente controle (T.Am.C) e Temperatura ambiente irradiada T.Am.I) em vermelho	8
Figura 18 - In se irr To ar (T	nibição do crescimento de <i>S. aureus</i> na amostra após Swab na eringa. Temperatura Alta controle (T.A.C) e Temperatura alta radiada (T.A.I) na cor preta; Temperatura baixa controle (T.B.C) e remperatura baixa irradiada (T.B.I) em cinza Temperatura mbiente controle (T.Am.C) e Temperatura ambiente irradiada T.Am.I) em vermelho.	9
Figura 19 - R do	Redução de microrganismos nas diferentes temperaturas testadas o líquido de preservação67	1
Figura 20 - M rin	letodologia geral de contaminação e descontaminação ex vivo de m de porco64	4
Figura 21 - R	Rim de porco perfundido68	5
<b>Figura 22</b> - S b)	Sistema de descontaminação de rim porcino. a) máquina Lifeport, ) fonte de luz UV-C, c) bomba peristáltica	6
<b>Figura 23</b> - B S	Bactérias recuperadas da infecção com S. aureus. Crescimento de S. aureus durante as 4h de perfusão e iradiação UV-C67	7
Figura 24 - Ba in pe 11 tre si ar	Bactérias recuperadas da infecção com <i>S. aureus</i> no líquido. O nóculo inicial de <i>S. aureus</i> , HTK é a amostra estéril do líquido de erfusão, T0 é a amostras de HTK inicial com bactéria <i>S. aureus</i> , h é o HTK com bactéria <i>S. aureus</i> após 1h de infusão, HTK rocado é a amostra do líquido de preservação nova trocada no istema para continuar a perfusão do rim e No rim corresponde as mostras maceradas após da descontaminação	8
Figura 25 - E	spectro de absorbância do Custodiol® irradiado após a perfusão o órgão72	2
Figura 26 - C fik	Citotoxicidade do líquido de preservação (Custodiol® HTK) em broblastos durante 4 h de perfusão do órgão	3

## LISTA DE TABELAS

 Tabela 1 -Tempos de coleta de amostras irradiadas convertidas em doses.
 44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV	Ultravioleta
DRC	Doença renal crônica
Pmp	Por milhão de população
DRT	Doença renal terminal
MPH	Máquina de perfusão hipotérmica
FTE	Função tardia do enxerto
НТК	Histidina-Triptofano-Cetoglutarato
PBS	Phosphate Buffered Saline
LAT	Laboratório de Apoio Técnico
BHI	Brain Heart Infusion

# SUMÁRIO

OBJET	TIVO DESTA DISSERTAÇÃO	23
1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Motivação para este trabalho	24
1.2.	Revisão geral de conceitos	26
1.2.1	Rins	26
1.2.2	Perfusão de rins	28
1.2.3	Máquina de perfusão LifePort® Kidney Transporter	29
1.2.4	Staphylococcus aureus	30
1.2.5	Radiação Ultravioleta e Descontaminação	31
2	Objetivos deste trabalho	35
2.1	Geral	35
2.2	Específicos	35
3	Contaminação e descontaminação in vitro do líquido circulante	37
3.1	Objetivos específicos	37
3.2	Metodologia	37
3.2.1	Microrganismo	37
3.2.2	Sistema de descontaminação	38
3.2.3	Descontaminação de <i>S. aureus</i> em PBS	41
3.2.4	Testes para determinar alterações no líquido de preservação Custodiol <sup>®</sup> HTK	<sup>°</sup> ou . 43
3.3	Resultados e discussão	44
3.4	Conclusões parciais	52
4	Simulação <i>in vitro</i> com modelo experimental renal variando os parâmet físicos da perfusão em processo de contaminação e descontaminação.	ros 53
4.1	Objetivos específicos	53
4.2	Metodologia	53
4.2.1	Microrganismo	53
4.2.2	Sistema de descontaminação	53
4.2.3	Descontaminação de S. aureus modelo experimental de rim	54
4.3	Resultados e discussão	56
4.4	Conclusão parcial	61
5	Perfusão e descontaminação <i>ex vivo</i> de rim de porco	63
5.1	Objetivos específicos	63
5.2	Metodologia	63
5.2.1	Microrganismo	63

5.2.2	Sistema de descontaminação 63
5.2.3	Contaminação e descontaminação de <i>S. aureus</i> no líquido de preservação, durante a perfusão de um rim suíno
5.2.4	Testes para determinar alterações no líquido de preservação Custodiol <sup>®</sup> ou HTK
5.3	Resultados e discussão67
5.4	Conclusão parcial74
6	Conclusão75
	REFERÊNCIAS77

## **OBJETIVO DESTA DISSERTAÇÃO**

O transplante de órgãos está entre as técnicas mais promissoras para aumento de longevidade e qualidade de vida dos seres humanos. A ciência de um modo geral, tem permitido grandes avanços e tornado os transplantes técnicas rotineiras. No entanto, ainda há um grande descompasso entre a procura e oferta e há muitos mais necessitados do que doadores. Além disso, a rejeição de órgãos devido às certas doenças é muito alta. Finalmente há grandes avanços de complicações devido às infecções transferidas do doador para o receptor.

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou, a capacidade de descontaminação de pulmão para transplante, durante a perfusão. Neste trabalho queremos demonstrar as primeiras viabilidades das possíveis diminuições da carga de microrganismos durante a perfusão de transplante de rins. Se bem sucedido, esta técnica deverá melhorar em muitas das condições e disponibilidade de órgãos para transplantes. Além disso, usamos técnicas que preservam a integridade do órgão bem como do paciente que receberá o órgão.

Os experimentos aqui realizados são com modelos e deve precisar de subsídios para os próximos passos.

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias constituem um componente importante para a vida no planeta Terra. São encontradas em qualquer ambiente e organismo, inclusive nos seres humanos. Algumas delas são importantes para os hospedeiros e outras são prejudiciais, gerando doenças que em muitos casos podem ser fatais.<sup>1</sup> Devido ao seu mecanismo de reprodução rápida, sua multiplicação pode ser gerada em minutos ou horas, elas se adaptam rapidamente às mudanças no ambiente e uma medida de solução para controlar a multiplicação bacteriana são os antibióticos.<sup>2-3</sup>

O uso de antibióticos, para controlar a reprodução bacteriana, não tem sido tão bemsucedido porque bactérias que são naturalmente resistentes a um ou vários tipos de antibióticos são selecionadas gerando o grande problema da resistência antimicrobiana e permitindo o progresso da infecção. Além disso, o uso indiscriminado e irracional de antibióticos significa que há maior pressão seletiva e que eles têm a oportunidade de aumentar os mecanismos de resistência aos antibióticos.<sup>4</sup>

Existem técnicas, já consagradas no passado, para controlar ou eliminar microrganismos, como o uso de luz ultravioleta (UV) para esterilizar materiais, alimentos, água, entre outros, que foram deixados de lado em vista da inativação química.<sup>5</sup> A irradiação através da luz UV é uma técnica que usa radiação de 100 a 400 nm no espectro eletromagnético. Tem quatro sub-tipos de radiação UV podem ser distinguidos: vácuo UV (100-200 nm), UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315 nm) e radiação UV-A (315-400 nm).<sup>6</sup> Demonstra-se que o mais microbicida é o UV-C, neste caso, o UV-C será usado, através de lâmpadas, provocando alterações em biomoléculas, inicialmente das paredes e membranas celulares e até no material genético de microrganismos, de forma a atingir a inativação microbiana, quanto às suas funções de manutenção do organismo e/ou de replicação.

Por outro lado, o transplante renal representa o tratamento adequado para pacientes com doença renal crônica avançada (DRC). No entanto, a falta de órgãos disponíveis e a contaminação de órgãos por patógenos que muitas vezes são resistentes a antibióticos, não permitem seu uso para doação e podem aumentar o número de pacientes na lista de espera e acionar seus números de mortalidade.<sup>7</sup>

Devido a tudo isso, a busca por novas formas de descontaminação e verificação da viabilidade do uso da técnica para a descontaminação de rins, torna-se a motivação deste estudo, que é baseado em testes que foram realizados utilizando luz UV-C como agente microbicida atuando na etapa de perfusão dos líquidos circulantes em pulmões humanos, com sucesso.<sup>8</sup>

Para realizar o projeto de descontaminação de rins para transplante, foram realizadas experiências in vitro de descontaminação líquida (PBS) circulando com 5-6 log(UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* através do sistema de descontaminação por luz UV-C permitindo avaliar eficiência e integridade do líquido de perfusato. Foi proposto um modelo de contaminação renal *in vivo* em ratos com 7-8 log (UFC/mL) de *S. aureus* e provas *ex vivo* de contaminação e descontaminação de rins de porco infundidos em uma máquina de perfusão LifePort. As metodologias, resultados e conclusões parciais são apresentadas individualmente, por capítulos, para cada um dos procedimentos mencionados acima.

A expectativa deste trabalho é eliminar ou reduzir a carga bacteriana do líquido perfundido pelo órgão e dos resíduos bacterianos que permanecem no tecido do mesmo, garantindo descontaminação bem-sucedida.

#### 1.1 Motivação para este trabalho

Nos últimos anos, tem sido comprovado que há um aumento de infecções por bactérias resistentes ou multirresistentes, causando anualmente mais de 700.000 mortes em todo o mundo.<sup>9</sup> Somado a isso, o grande número de órgãos que podem ser transplantados como conseqüência da infecção por esses patógenos prejudica 40.740 pessoas que estão em lista de espera no Brasil para transplante de órgãos,<sup>10</sup> devido ao fato de que as infecções são a principal causa de morbidade.<sup>11</sup>

O transplante renal é atualmente uma atividade muito comum em países grandes como Estados Unidos, Brasil, Índia e China, melhorando assim a qualidade de vida em pacientes com insuficiência renal irreversível (doença renal crônica ou DRC), que se tornou um problema de saúde pública global.<sup>12</sup>

O Brasil é o segundo país com mais transplantes de rins de doadores vivos e o quarto com mais doadores falecidos até o momento. Nos últimos seis anos (2012-2018), a taxa de transplante desse órgão permaneceu em 28,5 transplantes por milhão de população (pmp), aumento de 10,3% na doação renal de doadores falecidos e decréscimo de 32,9% nos doadores vivos.<sup>10</sup>

Além disso, dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos indicam que São Paulo é a cidade com mais pacientes em lista de espera para receber a doação de um rim, com um total de 12.301 pessoas, dados que agregam importância à pesquisa.<sup>10</sup> O aproveitamento de órgão, mesmo que com certos patógenos, pode melhorar em muito a situação.

Existe uma alternativa para o tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas em doadores de órgãos sólidos vivos e não vivos antes do processo de transplante, como o tratamento com antibióticos. Esses tratamentos são limitados a infecções leves e específicas, como uma infecção local, como meningite bacteriana ou endocardite, o doador vivo é tratado com terapia antimicrobiana por 48 horas ou mais dias (dependendo do caso) e após a infecção ser controlada clinicamente e não existe contra-indicação para o transplante, o órgão pode ser doado.<sup>13-14</sup> Quando o paciente morre com sintomas de meningoencefalite ou qualquer doença viral de etiologia indeterminada, o órgão não é considerado para transplante.<sup>14</sup> Até o momento, nenhum tratamento da infecção direta em órgãos, especificamente nos rins, durante o processo de perfusão foi registrado na literatura. Certamente, esta possibilidade agregaria muito ao sistema.

Há ainda, o crescente problema da resistência que certos microrganismos como as bactérias, adquiriram aos antibióticos. Estes microrganismos têm a capacidade inata de encontrar novas maneiras de resistir aos tratamentos e podem transmitir material genético que permite que outras bactérias se tornem resistentes aos medicamentos.<sup>15</sup> Os vírus que apresentam altas taxas de mutação, as quais permitem uma evolução particularmente rápida,<sup>16</sup> levaram à busca e necessidade de novas técnicas ou alternativas para o tratamento das mesmas. Essas alternativas correspondem a técnicas ópticas, como inativação por radiação por luz UV.

Com esta técnicas se tem a capacidade de inativar microrganismos com a presença de luz sem a necessidade de usar antibióticos que se ajustam em uma mutação

como no caso das bactérias ou mesmo expor o receptor á cargas elevadas de microrganismos. Aliado a tudo isto, ainda temos o fato que naturalmente o órgão carrega vários microrganismos, cuja diminuição antes do implante deve melhorar as condições de sucesso e melhorar as chances para o receptor.

### 1.2 Revisão geral de conceitos

### 1.2.1 Rins

O rim é um órgão pareado em forma de feijão localizado entre o nível da décima segunda vértebra torácica e a terceira vértebra lombar.<sup>17</sup> Cada rim tem cerca de 12 cm de comprimento, aproximadamente do tamanho de uma mão fechada (figura 1).

Entre as funções dos rins estão regular a pressão arterial, água, sódio, potássio, acidez, minerais ósseos e hemoglobina mas as funções principais são filtrar o sangue, remover resíduos, controlar o equilíbrio de fluidos do corpo e manter os níveis certos de eletrólitos.<sup>18</sup> Por outro lado, cerca de 22% do débito cardíaco vai para os rins e cerca de 20% do plasma é filtrado, produzindo cerca de 170 L de filtrado glomerular por dia e 99% disso é reabsorvido à medida que flui ao longo dos néfrons, de modo que apenas 1,5 L de urina é produzida por dia.<sup>18</sup>







Como mencionado acima, os rins removem resíduos e isso ocorre em pequenas unidades que são os néfrons. Observa-se que é uma parte muito importante desses órgãos, por isso quando diz-se que, se os rins falham, é devido a doenças que estão comprometendo esses néfrons. Como as doenças destroem lenta e silenciosamente essas unidades, apenas com os anos de idade são descobertas irregularidades nos rins e é aí que começam os problemas renais. Tais problemas podem resultar de doenças como doença renal diabética, pressão alta, hipertensão, doenças glomerulares e doenças renais, hereditárias e congênitas, entre outros.<sup>19</sup> Se essas doenças piorarem, ocorrerá uma perda gradual da função renal gerando a DRC e doença renal terminal (DRT), onde apenas diálise ou transplante renal será a solução definitiva para os pacientes.<sup>19</sup>

#### 1.2.2 Perfusão de rins

Após a extração há várias fases importantes. A remoção, o armazenamento e a perfusão de órgãos até o transplante para o receptor alvo, são fatores importantes para o sucesso do procedimento. Na maioria dos casos, o doador e o receptor não estão no mesmo hospital; portanto, o tempo se torna um elemento valioso para o transporte do órgão e isso implica que métodos eficazes, seguros e confiáveis devem ser implementados para preservar o órgão *ex vivo* até que o transplante possa ser realizado. Por outro lado, a grande demanda de transplante atualmente em andamento e a escassez de doadores também tornam necessário o aprimoramento contínuo das técnicas de preservação de órgãos, com o objetivo de aumentar a viabilidade após a doação até o transplante.<sup>20</sup> O processo de perfusão consiste em substituição do sangue por uma solução de preservação.

Uma das técnicas mais usadas no transplante renal é a preservação hipotérmica, especificamente por meio de uma máquina de perfusão hipotérmica (MPH). Foi utilizado por Belzer e colaboradores em 1967, onde a combinação de perfusão contínua e armazenamento hipotérmico mostrou uma nova visão para preservação de órgãos, pois conseguiu preservar por 72 h rins de caninos com sucesso.<sup>21</sup>

A perfusão de órgãos com a técnica MPH consiste em introduzir o rim em um dispositivo que mantém um fluxo controlado continuamente ou pulsátil com solução de preservação a frio (0-4 °C). Esse fluxo permite uma completa perfusão do órgão, além de limpar a corrente sanguínea dos microtrombos e facilitar a eliminação dos produtos metabólicos finais.<sup>22</sup> A MPH tem benefícios como taxa reduzida de função tardia do enxerto (FTE) e tendência a melhorar a sobrevida global do enxerto em comparação com outras técnicas de preservação hipodérmica nos rins.<sup>23</sup> Além disso, eles prolongam a vida útil do órgão extraído, diminuindo a taxa de metabolismo e as demandas de oxigênio em baixa temperatura.<sup>24</sup>

A solução de perfusão usada para esta técnica de HMP é a solução de Custodiol<sup>®</sup> ou HTK. É uma solução do tipo intracelular, praticamente livre de cálcio e com concentrações muito baixas de sódio, incorpora manitol e histidina como substâncias impermeabilizantes (têm um efeito tampão) e incorporam triptofano e cetoglutarato, que são protetores e estabilizadores da membrana celular.<sup>22</sup> A premissa de nosso trabalho, é que durante a perfusão, um elevado número de microrganismos contido

no órgão poderão ser removidos e ficaram em solução. Se fizermos a circulação do líquido promovendo sua descontaminação, teremos consequentemente um órgão menos contaminado.

## 1.2.3 Máquina de perfusão LifePort® Kidney Transporter

Lifeport é fabricada nos Estados Unidos da América pela Organ Recovery Systems e tem a função de ser utilizada para a perfusão contínua hipotérmica de rins em máquina. A LifePort é um dispositivo de transporte portátil concebido para manter um rim transplantável em condições frias e assépticas, enquanto perfunde o mesmo simultaneamente. Sua parte superior, tem um alojamento plástico isolado que protege o rim e o perfusato dentro de um Circuito de Perfusão descartável "cassete". De forma geral os componentes da LifePort são mostrados na figura 2 que incluem um recipiente de gelo, superfície de bomba, quatro baterias de íons de lítio, eletrônica, detectores de bolhas, sensores, painel de controle e display externo.

O equipamento é projetado para integrar com o ambiente clínico utilizando suprimentos prontamente disponíveis, requisitando mínima intervenção do usuário e também sendo fácil de utilizar. Uma vez que o recipiente de gelo estiver corretamente carregado, mesmo quando a LifePort estiver desligada, ela manterá os rins hipotérmicamente no mesmo nível que os métodos de armazenagem estáticos convencionais (saco de gelo).



Figura 2 - Partes da LifePort® Kidney Transporter.

Fonte: LIFEPORT...<sup>25</sup>

O sucesso do uso desta máquina de preservação rim utilizando a perfusão contínua, são apresentados em diferentes trabalhos onde explicam que as condições do rim para transplante melhoram.<sup>26-29</sup> Aumenta o sucesso do procedimento por ser a máquina e o líquido de alto custo, o procedimento ainda é pouco usado no Brasil, fazendo uso do método convencional de banho de gelo.

Um estudo importante, que verifica a viabilidade do uso desta técnica para a descontaminação de órgão, foi a descontaminação dos líquidos circulantes durante a perfusão de pulmões humanos utilizando luz UV-C como agente microbicida, com sucesso.<sup>8</sup> Nesse estudo, a irradiação UV-C foi adicionada a um método para o tratamento de pulmões de doadores humanos infectados com VHC (vírus da hepatite C) prevenindo a transmissão do VHC com os métodos de eliminação viral física durante a perfusão pulmonar normotérmica *ex vivo* (EVLP).<sup>8</sup> Como as técnicas de perfusão visam preservar a viabilidade dos órgãos desde a doação até o transplante, elas são realizadas em enxertos de órgãos previamente aos procedimentos de transplante, o que não introduz etapas adicionais ao próprio transplante e, portanto, não compromete a segurança do procedimento.

#### 1.2.4 Staphylococcus aureus

*S. aureus* é uma bactéria que pertence à família Micrococcaceae, esférica, em forma de coco com diâmetro aproximadamente de 0,5 a 1,5 µm. Eles podem aparecer em diferentes formas como isolados, em pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente devido à sua divisão celular. Outra característica é que eles são não esporulados, não encapsulados e anaeróbios facultativos.<sup>30</sup>

Esta bactéria Gram-positiva faz parte da microbiota humana normal e pode ser encontrada no trato respiratório e na pele de pessoas saudáveis. É um importante patógeno bacteriano humano que causa uma ampla variedade de manifestações clínicas, como espinhas, celulite, pneumonia, endocardite, septicemia, meningite, entre outras.<sup>30</sup> Foi uma das primeiras bactérias controladas por antibióticos como a penicilina em 1940, mas devido ao seu grande potencial de evolução e adaptação, gerou resistência, tornando-se uma das espécies mais importantes de infecções hospitalares e comunitárias.<sup>31</sup>

Por outro lado, *S. aureus* pertence a um gênero que possui grande capacidade de adaptação, afetando todas as espécies conhecidas de mamíferos, inclusive roedores comuns de laboratório.<sup>32</sup> É por isso que, graças à sua fácil propagação, elas podem ser transmitidas de uma espécie para outra, sendo frequentes os casos humanoanimal e vice-versa.<sup>33</sup> Daí a importância de se conhecer melhor esse patógeno, pois, além dos animais, os mecanismos de invasão também incluem fomitos e contato pessoa a pessoa. Nos últimos anos, a incidência de bacteremia por *Staphylococcus* aumentou significativamente, uma vez que essa espécie aumentou sua frequência de ocorrência, tornando-se a principal causa de infecções na corrente sanguínea e intoxicação alimentar. O *S. aureus* é um excelente modelo de microrganismo para uso em laboratório e também para demonstrações de ações descontaminantes.

#### 1.2.5 Radiação Ultravioleta e Descontaminação

A luz solar tem um espectro contínuo, onde encontramos divisões atribuídas a um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ): radiação ultravioleta (UV) (100-400nm), visível (400-780nm) e infravermelho (>780 nm).<sup>34</sup> A radiação ultravioleta é uma radiação eletromagnética com  $\lambda$  entre 100 e 400 nm, classificada como: UV-C (100-290 nm), UV-B (290-320 nm) e UV-A (320-400 nm). A radiação UVA, por sua vez, é classificada em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (320-340 nm)<sup>35</sup> (figura 3).



Figura 3 - Espectro eletromagnético de luz ultravioleta. Fonte: Elaborada pela autora.

Desde 1980, começou-se a falar sobre o UV como um potencial para a desinfecção da água em substituição ao cloro, que é tóxico para a vida aquática.<sup>36</sup> No trabalho publicado por John em 1985, começa a tratar a luz UV germicida e fungicida, que é o nome alternativo de UV-C, capaz de inativar microrganismos.<sup>37</sup> Atualmente, o UV-C é usado para desinfetar materiais,<sup>38</sup> inativar microrganismos como bactérias que causam doenças do tipo infecção hospitalar que devido à seleção de espécies resistentes a antibióticos<sup>39-40</sup> e até trabalhos que consistem em reduzir a carga microbiana de diferentes alimentos, como vegetais, frutas, entre outros.<sup>41-44</sup>

O mecanismo de ação do UV-C consiste na indução de alterações em biomoléculas, inicialmente das paredes e membranas celulares e até no material genético de microrganismos. A excitação eletrônica causada por UV-C promove rompimento de ligações químicas, produzindo dímeros de timina, entre outros produtos, inativandoos sem etapas intermediárias, destruindo sua capacidade de multiplicar, e consequentemente interrompendo a ação de causar doenças (figura 4).<sup>45</sup> Esse dano fotoquímico nas células vivas de bactérias, vírus, protozoários, fungos, leveduras e algas é letal. O gráfico a seguir mostra a relação entre o efeito germicida e o comprimento de onda, mostrando um efeito máximo a 254 nm e diminuindo aproximadamente a zero em 300 nm (figura 5).<sup>46</sup>



Microrganismos





Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 - Letalidade dos comprimentos de ondas UV.

Fonte: GONÇALVES.46

O uso desse agente físico para inativação tem várias vantagens: sendo uma técnica física, não se precisará armazenar, manusear, transportar ou armazenar produtos químicos ou toxinas poluentes para o meio ambiente e ao ser humano. O uso da desinfecção por UV-C é fácil para o operador, ocupa menos espaço para suas pequenas lâmpadas e o tempo de contato para efetividade é curto em comparação com outros métodos de desinfecção. Ao se usar UV-C, apesar de ser necessária a dose de energia muito pequenas (10 mJ/cm<sup>2</sup> a 1 mJ/cm<sup>2</sup>), ainda a radiação pode causar danos ao meio que contém os microrganismos, causando efeitos indesejáveis, este é uma desvantagem, mas que pode ser devidamente controlada.
#### 2 Objetivos deste trabalho

## 2.1 Geral

 Avaliar a viabilidade do uso da radiação UV-C para a descontaminação de rim através da irradiação de solução de preservação de órgãos durante sua circulação no processo de perfusão de órgão.

#### 2.2 Específicos

- Avaliar a capacidade de descontaminação da solução de preservação contaminada com *S. aureus* circulando por meio de irradiação com luz ultravioleta-C (UV-C) em 254 nm.
- Avaliar a preservação de características básicas de solução de perfusão, quando for submetida ao UV-C.
- Desenvolver um modelo experimental *in vitro*, que tenha caracteristicas de rim, para contaminação e descontaminação de líquido circulante de preservação de órgão variando parâmetros físicos da perfusão.
- Avaliar a capacidade de descontaminação da solução de preservação circulando pelo rim de porco *ex vivo* infectado por meio de irradiação com luz ultravioleta-C (UV-C) em 254 nm.

## 3 Contaminação e descontaminação *in vitro* do líquido circulante

Neste capítulo, são apresentados os objetivos específicos, todos os processos experimentais de contaminação por *S. aureus* no líquido circulante PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*, solução tampão fosfato-salino) e, em seguida, o processo de descontaminação por irradiação UV-C no líquido que circula pelo sistema desenvolvido, cada um desses processos é mostrado com seus respectivos resultados, discussões e conclusões.

## 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de descontaminação da solução de preservação contaminada com *S. aureus* circulando por meio de irradiação com luz ultravioleta-C (UV-C) em 254 nm.
- Avaliar a preservação de características básicas de solução de perfusão, quando for submetida ao UV-C.

# 3.2 Metodologia

#### 3.2.1 Microrganismo

As cepas utilizadas nos experimentos foram de *Staphylococcus aureus*, incubadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37 °C por 18 h com agitação orbital (Quimis®) a 150 rpm. Após o crescimento microbiano overnight, as bactérias foram diluídas na proporção 1:10, foram incubadas por 4 h com agitação a 150 rpm e centrifugadas (5202 Eppendorf<sup>®</sup>) a 3000 rpm por 10 min. O sedimento celular foi lavado com solução salina tampão de fosfato (PBS) (pH = 7,4) por centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sedimento celular foi lavado com solução salina tampão de fosfato (PBS) (pH = 7,4) por centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sedimento celular foi lavado com por 10 min. O sedimento celular final foi ressuspenso em PBS até uma densidade celular de 5-6 log(UFC/mL) (Unidades formadoras de colônias por mililitros), verificado pela densidade óptica em 600 nm no espectrômetro (Cary UV-Vis50, Varian).

#### 3.2.2 Sistema de descontaminação

O sistema de descontaminação por luz UV-C foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico da USP (LAT, Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo) (figura 7).

O sistema é composto por um compartimento tubular metálico contendo 4 lâmpadas tubulares UV-C com emissão a 254 nm, arranjadas simetricamente em torno de um tubo de quartzo inseridas num suporte tubular que minimiza o espalhamento da cavidade iluminada. Ao centro da distribuição geométrica das lâmpadas, um tubo de quartzo autoclavável conduz o fluido a ser descontaminado para próximo das lâmpadas. O suporte tubular foi montado de forma que um sensor de segurança evite que ele seja ativado inadvertidamente, enquanto o suporte estiver aberto. Um botão do tipo "liga/desliga" está disponível na caixa com reatores adjacentes ao sistema, de modo que os reatores alimentem as lâmpadas. Um conector de alimentação AC bivolt (127 V/220 V) faz a alimentação externa do dispositivo a partir da rede elétrica.

Além disso, as 4 lâmpadas emitem uma irradiância total de 96 mW/cm<sup>2</sup> e dose entregue ao sistema foi estimada, tendo em conta a geometria de entrega das lâmpadas e o volume do tubo:

Para calcular a dose entregue ao sistema ou dose volumétrica, foi feita uma relação dessa dose entregue com a dose superficial:

Dose Superficial de UV-C é igual:

$$D_{UV} = \frac{dE}{dA} \tag{3.1}$$

onde, E é a energia e A é o elemento área da superfície da lâmpada irradiando o tubo.

Se isolamos E,

$$dE = D_s dA \tag{3.2}$$

Para determinar a dose, temos que a área considerada será equivalente à seção de área da lâmpada cuja radiação atinge o tubo, conforme representado na figura 6. Então a área será igual a:

$$A = 2\theta r_L l_L \tag{3.3}$$

Onde  $\theta$  é o ângulo entre o eixo que liga o centro da lâmpada ao centro do tubo e a linha que indica a máxima amplitude da radiação que atinge o tubo,  $r_L$  é o raio da lâmpada e  $l_L$  é o comprimento da região irradiada do tubo, equivalente ao comprimento da lâmpada. Cada uma destas variáveis são apresentadas na figura 6. A partir disso, obtemos da equação 3.2 a energia total entregue em função da dose de luz, conforme mostra a equação 3.4.

$$E = D_{UV} 2\theta r_L l_L \tag{3.4}$$

A dose (D<sub>UV</sub>) também pode se reescrever da seguinte forma:

$$D_{UV} = \frac{dE}{dA} = \Phi_s t \tag{3.5}$$

Onde  $\phi_s$  representa a intensidade superficial de luz ou irradiância, e *t* o tempo.

Substituindo a equação 3.5 em 3.4:

$$E = \Phi_s \, 2\theta \, r_L l_L \, t \tag{3.6}$$

Agora, o interesse é calcular a densidade de energia entregue por volume e não por área, ou seja, a Dose Volumétrica ( $D_v$ ) de energia de entregue. Fazendo uma relação entre a dose superficial e volumétrica, a equação fica:

$$D_V = \frac{dE}{dV} = \frac{E}{V} \tag{3.7}$$

Onde E é a energia e V é o volume de líquido no sistema.



Figura 6 - Geometria das lâmpadas e tubo de quartzo. Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, Substituindo a equação 3.6 em 3.7, a Dose Volumétrica ( $D_v$ ) de energia entregue será:

$$D_V = \frac{E}{V} = \frac{\Phi_s \ 2\Theta \ r_L l_L \ t}{V} \tag{3.8}$$

Tendo em conta a figura 6, se pode assumir que:

- \* A irradiância de UV-C para 1 lâmpada  $\phi_s = 0,024 \text{ W/cm}^2$
- A irradiância de UV-C para 4 lâmpadas  $\phi_s$  = 0,096 W/cm<sup>2</sup>

• 
$$2\theta = 36^\circ = \frac{\pi}{5} = 0,597$$
 rad

$$r_L = 0.8 \text{ cm}$$

• 
$$l_L = 11 \text{ cm}$$

Substituindo os dados anteriores, a equação 3.8 fica:

$$D_V = \frac{(0,096\frac{W}{cm^2})(0,597\,rad)(0,8\,cm)(11\,cm)\,t}{V}$$
(3.8)

$$D_V = \left(\frac{0.53}{V}\right)t\tag{3.8}$$

Como  $D_v$  tendo como unidade J/cm<sup>3</sup>.

Então a dose total entregue dependerá do volume do líquido e o tempo de irradiação.

Por outro lado, o sistema também está composto por um circuito de tubos de silicone e uma bomba peristáltica (WP10, Welco, Japão) com um fluxo de perfusão contínuo de 200 mL/min. Os tubos de silicone conectam a bomba a um reservatório de líquido que passam pelas lâmpadas.

#### 3.2.3 Descontaminação de S. aureus em PBS

Após o inóculo atingir a quantidade de log desejada (5-6 log(UFC/mL)), 3 mL da bactéria foi misturado em 1 L de PBS com pH 7,4 e circulou através do sistema de descontaminação de luz UV-C.



Figura 7- Esquema para sistema de descontaminação UV-C. a) A solução a ser descontaminada foi mantida em reservatório, Circuito de perfusão (Cassete). b) do reservatório, a solução é bombeada através do circuito, c) onde é irradiada pela fonte de luz UV-C e envia enviada de volta ao reservatório através do rim. A fonte de luz UV-C (c, d) é composta por quatro lâmpadas que irradiam um tubo de quartzo (e) por onde flui a solução de preservação, que pode ser vista pela vista lateral (f).

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma amostra de 0,3 mL foi coletada no tempo zero, quando a fonte de luz UV-C foi ligada no sistema, as amostras foram coletadas a cada 20 minutos e após duas horas, as amostras foram coletadas apenas a cada hora, até completar 4 horas de irradiação. Após a coleta de cada amostra, foi feita uma diluição seriada 10<sup>-5</sup>, seguido de plaqueamento em triplicatas em placas de Petri com meio BHI e incubadas a 37°C, passado 24 horas de crescimento foi realizada a contagem bacteriana (figura 8).

Este experimento foi realizado em três ocasiões, sendo com coleta em triplicata, e da mesma maneira os respectivos controles de cada experiência foram realizados sem a presença de luz UV-C.



Figura 8 – a) Contagem de bactérias de placas Petri dos grupos irradiados com luz UV-C e b) placas do grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

# 3.2.4 Testes para determinar alterações no líquido de preservação Custodiol<sup>®</sup> ou HTK

Para investigar as alterações no líquido, uma amostra do líquido de preservação (Custodiol<sup>®</sup>) foi coletada nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h e 4 h de irradiação e foi realizado um espectro de absorbância (Cary UV-Vis50, Varian) entre as regiões de 270 nm e 500 nm.

Além disso, foi feito um teste de citotoxicidade do Custodiol<sup>®</sup>, utilizando células fibroblastos dérmicos neonatal (HDFn, ATCC) cultivadas em meio de cultura *Dulbecco s Modified Eagle s Medium* (DMEM – Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell). As células foram semeadas em placas de 96 poços num total de 104 células por poço e foram deixadas para aderir na placa por 24 h. Em seguida foram feitas incubações em triplicata com amostras de Custodiol<sup>®</sup> durante a circulação e irradiação do líquido, que foram coletadas em diferentes tempos do protocolo de irradiação correspondentes 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 2 h, 3 h e 4 h.

A placa foi incubada por 4 h em temperatura de 4°C. Após esse período os poços foram lavados 2x com tampão fosfato salino (PBS) e foi realizado um teste colorimétrico para viabilidade celular (MTT – Sigma). As células foram incubadas com o meio sem fenol com 10% da solução de MTT por 4 h. Após a incubação, a

absorbância foi lida em 590 nm e as médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular foram plotados em gráficos no Origin Lab.

#### 3.3 Resultados e discussão

As figuras a seguir representam as médias dos resultados obtidos, observando a quantidade unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas de *S. aureus* para diferentes tempos de coleta durante um total de quatro horas de irradiação. Os gráficos foram feitos em função da dose e foi calculado usando, D = t i. Onde, D é a dose em (J/cm<sup>2</sup>), t é o tempo em (s) e i é a Irradiância em (W/cm<sup>2</sup>).

Então, Irradiância = 0,58 mW/cm<sup>2</sup> e os diferentes tempos de coleta em doses ficaram:

Tempos de	Doses		
coleta (min)	(J/cm²)		
2,5	0,08004		
5	0,174		
7,5	0,25404		
10	0,348		
12,5	0,42804		
15	0,522		
17,5	0,609		
20	0,696		
30	1,044		
40	1,392		

 Tabela 1 -Tempos de coleta de amostras irradiadas convertidas em doses.

Continua

<u> </u>	~
( 'ontin	112020
COLICIT	uacao

60	2,088		
80	2,784		
100	3,48		
120	4,176		
180	6,264		
240	8,352		

Fonte: Elaborada	pela	autora.
------------------	------	---------

A figura 9 mostra o comportamento da bactéria sem irradiação como controle e irradiada com luz UV-C em função das doses de entregue de UV-C, evidenciando a redução máxima da mesma em PBS.



Figura 9 - Quantidade de log (UFC/mL) de *S. aureus* recuperados em 4 horas. Em vermelho S. *aureus* irradiada com UV-C e em preto o controle sem irradiação.

Fonte: Elaborada pela autora.

A curva da figura 9 em preto, mostra que na ausência de ação descontaminante, há um aparente aumento da carga microbiana com os tempos longos. O aumento de quase 1 log para tempos de 2 h (4 J/cm<sup>2</sup>), pode ser compatível com a multiplicação final da carga microbiana em solução.

Como evidenciado na figura 9, aos 30 minutos de irradiação, houve redução na presença das bactérias no líquido circulante em aproximadamente 100%. Os experimentos foram repetidos nas mesmas condições apenas por 30 minutos de exposição à luz UV-C e coletando amostras a cada 2,5 minutos.

A figura 10 demonstra a média da carga microbiana em unidades formadoras de colônias em função das doses de luz entregue, apresentando uma redução de mais de um decimal (90% aproximadamente) em 10 minutos de irradiação (figura 10).



Figura 10 - Quantidades médias de *S. aureus* coletadas em 30 minutos. Em vermelho *S. aureus* irradiada com UV-C e em preto o controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

Notamos que ao atingir 0,428 J/cm<sup>2</sup> (tempo = 12,5 min) já havia ocorrido a redução de carga microbiana em 99,999% (praticamente eliminação total). Isto demonstra grande eficiência no procedimento de descontaminação do líquido de perfusão em processo circulante. Para observar de forma mais clara o intervalo de redução menor do que 0,428 J/cm<sup>2</sup>, um experimento mais detalhado nesta região foi realizado como mostrado na figura 10. A diminuição é acentuada já para doses baixas e deve ter

uma dinâmica de eliminação que vai além de um mecanismo exponencial simples. Em primeira aproximação poderíamos pensar que a carga microbiana obedece uma equação de tipo:

$$\frac{dC\mu}{dD} = -\gamma c_{\mu} \tag{3.9}$$

onde,  $C_{\mu}$  é a carga microbiana e  $\gamma$  é uma constante ( $\gamma = \frac{1}{D_0}$ ), onde  $D_0$  é a dose.

Isso resultaria em uma dependência exponencial com a dose (D = C t). Isto corresponderia a um gráfico linear na escala logarítmica, fato que não é verdade de um modo geral. Poderíamos dizer que para tempos curtos, ou seja, para doses menores do que 0,4 J/cm<sup>2</sup>, o gráfico é aproximadamente linear resultando em:

$$C(D) \sim C_0 e^{\frac{-D}{D_0} \left(\frac{J}{cm^2}\right)} = C(D) \sim C_0 e^{-12.5 D \left(\frac{J}{cm^2}\right)}$$
(3.10)

onde C é concentração após aplicação de uma dose D, C<sub>0</sub> é contaminação inicial.

Significando que mesmo com baixas doses a diminuição é considerável. O valor de  $D_0 \sim 0,08 \text{ J/cm}^2$  mostra que o decaimento da carga microbiana atingida com 0,08 J/cm<sup>2</sup> já é de aproximadamente 63%.

O fato de não termos uma dependência exponencial para todas doses, significa que a função pode ser melhor representada por algo como:

$$C = C_0 e^{-(\frac{D}{D_0})} \left[1 + f(D)\right]$$
(3.11)

onde D é dose,  $D_0$  é dose mínima e f(D) corresponde à uma função da dose.

Esta função f(D) é positiva, tem como limite:

$$\lim_{D\to 0} f(D) \cong 0$$

e que leva em conta toda uma dinâmica do processo de aderência e liberação de microrganismos bem como sua multiplicação, e não é o objetivo deste trabalho determinar f(D), mas isto poderá ser feito no futuro. O efeito representado pela função f deve ser minoritário.

Nos experimentos *in vitro* de descontaminação de PBS circulante, com apenas uma dose de aproximadamente 1,3 J/cm<sup>2</sup>, é possível reduzir 100% das bactérias que circulam no líquido (figura 9). Esta dose é atingida em 40 minutos de irradiação com UV-C. Comparando com diferentes estudos,<sup>47-49</sup> um deles, mais recente por Amasino *et al.*, Realizou descontaminação por UV-C de soluções parenterais e conseguiu eliminar 100% da carga microbiana com uma dose de 3,4 J/cm<sup>2</sup> em 30 minutos após a irradiação e cargas iniciais de microrganismos de 2,49 log (UFC/mL).<sup>50</sup>

O resultado mais importante deste estudo é que ficou demonstrada a capacidade do sistema em descontaminar o líquido circulante quando este está acoplado ao sistema UV-C de descontaminação. Esta é uma etapa importante para qualquer procedimento seguinte.

O tempo de descontaminação é um parâmetro importante pois, a desinfecção do órgão tem que ser realizada dentro de tempo hábil de permanência na máquina. Sendo capaz de promover uma descontaminação majoritária ao redor de 40 min, este quesito fica plenamente preenchido. Resta avaliar se o UV-C causou alguma alteração prejudicial ao líquido de perfusão.

Para investigar as alterações no líquido, uma amostra do líquido de preservação (custodiol<sup>®</sup>) foi coletada e analisada no espectro de absorbância (ver descrição 3.2.4.) (figura 11), mostrando degradação, alterações muito evidentes no gráfico nas bandas largas do líquido após de 4 h de irradiação comparada com o controle sem irradiar.



Figura 11 – Espectro de absorbância do Custodiol® irradiado utilizado durante a 4h de circulação do líquido pelo sistema.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por outro lado, também foram feitos testes de toxicidade, para saber se o UV-C causava alguma alteração em células (ver descrição 3.2.4.). Foi utilizado como controle fibroblastos (HDFn) com o meio ideal de cultura para as células, uma amostra do líquido de preservação (Custodiol<sup>®</sup> HTK) (sem irradiação), e as amostras de líquido irradiadas durante a circulação pelo sistema de descontaminação foram coletadas cada 10 min até completar 1 h e depois cada hora até completar as 4 h de descontaminação. As amostras foram depositadas numa placa de 96 poços colocadas para incubar em temperaturas de 4° C, mantendo a temperatura do líquido de preservação durante a perfusão (Figura 12).



**Figura 12** – Citotoxicidade do líquido de preservação (Custodiol<sup>®</sup> HTK) em fibroblastos durante 4 h de circulação do líquido pelo sistema.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico da figura 12 evidencia as absorbâncias das diferentes amostras do líquido de preservação irradiado nos diferentes tempos. A amostra HTK sem irradiação apresentou uma absorbância um pouco menor da absorbância do controle. Com relação ao controle das amostras do líquido coletadas durante os primeiros 50 min de irradiação e inoculadas nas células apresentaram maior viabilidade e após de 1 h de irradiação essa viabilidade começou a diminuir. Os valores mais baixos de viabilidade nas células foram coletados nos tempos de 2 h e 3 h de irradiação do líquido com absorvâncias menores a 0,2. Curiosamente na última hora de irradiação, ou seja, as 4 h de descontaminação, a viabilidade aumentou com uma absorbância maior a 0,4.

#### 3.4 Conclusões parciais

A descontaminação em líquidos translúcidos como PBS através da irradiação UV em comprimentos de onda de 254 nm com doses mínimas de 1 J/*cm*<sup>2</sup> é suficiente para eliminar altas cargas bacterianas de *S. aureus* em períodos de tempos curtos de 30 minutos. Por outro lado, mostra-se que ocorrem alterações no líquido de preservação durante e após da irradiação com UV-C durante 4 h de circulação pelo sistema de descontaminação, mas que não causam no tempo considerado de 1 h toxicidade aparente à célula.

# 4 Simulação in vitro com modelo experimental renal variando os parâmetros físicos da perfusão em processo de contaminação e descontaminação

Neste capítulo é apresentado o objetivo específico que consiste em desenvolver um modelo experimental de rim para contaminação e descontaminação de líquido circulante de preservação de órgão variando parâmetros físicos como temperatura com seus respectivos resultados, discussões e conclusões.

## 4.1 Objetivos específicos

 Desenvolver um modelo experimental *in vitro*, que tenha caracteristicas de rim, para contaminação e descontaminação de líquido circulante de preservação de órgão variando parâmetros físicos da perfusão.

#### 4.2 Metodologia

#### 4.2.1 Microrganismo

As bactérias S. aureus foram preparadas seguindo a descrição 3.2.1.

#### 4.2.2 Sistema de descontaminação

Em busca de novas formas de eliminar mais carga bacteriana que permanece no órgão sem alterá-la, foi desenhada uma metodologia que incorporou a solução de preservação (Custodiol) circulando por um modelo experimental de órgão e alterando parâmetros físicos como a temperatura do líquido circulante. Inicialmente, o modelo experimental (feito de uma esponja dentro de seringas) foi adaptado ao sistema de descontaminação (ver descrição 3.2.2) (Figura 13). Optamos pela escolha de uma esponja de cozinha comercial como modelo porque a função principal é absorver líquidos, fazendo retenção mecânica e além disso, a esponja estruturalmente apresenta poros, sendo empregada para simular a filtragem do rim. Temos que demonstrar a capacidade de contaminar e descontaminar tal modelo.



Figura 13 - Sistema de descontaminação por luz UV-C. a) modelo experimental para simular o rim, b) fonte de luz UV-C, c) bomba peristáltica.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.3 Descontaminação de S. aureus modelo experimental de rim

Após o inóculo atingir a quantidade de log desejada (5-6 log(UFC/mL)), 0,4 mL da bactéria foi inoculado no modelo, a fim de fluir para o sistema e atingir a esponja causando primeiro sua contaminação. Cada experimento foi realizado em três condições: 1) temperatura ambiente (25° C - 27° C), 2) temperatura baixa (15° C - 17° C) e 3) temperatura alta (36° C - 38° C). Cada uma destas temperaturas foi monitoradas com um termômetro digital (Minipa tipo vareta Mv-363) e um termômetro infravermelho (Minipa mt-350). Para manter a temperatura baixa, o modelo de rim foi submerso em gelo durante todo o experimento e para manter o modelo de rim em temperaturas altas, o modelo foi submerso em banho de maria sobre uma chapa aquecedora (Gehaka AA-840).

Uma amostra de 0,3 mL foi coletada no tempo zero, assim que a fonte de luz UV-C foi ligada, as amostras foram coletadas nos tempos 5, 10, 20, 40, 60 e a cada 60 min por 4 h de perfusão e descontaminação por UV-C. Todas as amostras coletadas foram ressuspensas e diluídas 10<sup>-5</sup> com PBS e todo e cada teste com diferentes condições de temperatura foram realizados em triplicata e da mesma forma os respectivos controles para cada teste foram realizados sem a presença de luz UV-C. Em seguida, foi realizado ultrassom (Maxsonic D-40XAE CTA do Brasil) por 20 minutos com temperatura de 27º C, na esponja extraída das seringas que formavam o fantoma, para tentar remover as bactérias aderidas e por último, foi realizado um SWAB na esponja após o ultrassom para monitorar a carga microbiana que permanece após o processo de descontaminação circulante.

Este experimento foi realizado em três condições e com triplicata das amostras para contagem de UFC/mL e da mesma maneira os respectivos controles de cada experiência foram realizados sem a presença de luz UV-C.

De modo geral, em função do tempo, após de instalar o modelo renal e adicionar o líquido de perfusão dentro do sistema o experimento foi feito durante um intervalo de tempo que começa desde a adição do líquido de perfusão no modelo, seguida adição de bactéria no líquido até a coleta das amostras irradiadas por UV-C como apresenta a figura 14.



Figura 14 – Metodologia em função do tempo do experimento.

#### 4.3 Resultados e discussão

A inibição do crescimento de *S. aureus* no modelo renal adaptado ao sistema de descontaminação de luz UV-C, foi analisada pela contagem do número de UFCs de maneira dependente da dose até 4 h e os resultados mostrados na figura 15. O comportamento do crescimento bacteriano nos experimentos controle com diferentes condições de temperatura foi mantido entre 5 e 6 logs (UFC/mL). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas diferentes faixas de temperatura testadas. Reduções bacterianas de 100% são geralmente observadas após 120 minutos de irradiação à temperatura ambiente e baixas temperaturas com uma dose de luz UV-C de 3 J/cm<sup>2</sup>.



Figura 15 - A inibição do crescimento de *S. aureus* com 4 h de radiação UV-C. Temperatura ambiente (T.Am.) em preto, temperatura baixa (T.B.) em vermelho e Temperatura alta (T.A.) em cinza.

Após cada experimento irradiado e controle, a esponja isolada (modelo experimental) foi colocada em dispositivo de agitação ultrassônica (Maxsonic D-40XAE, CTA do Brasil) durante 20 min a 27°C, para tentar retirar a maior quantidade de *S. aureus* do material. A inibição do crescimento bacteriano foi analisada pela contagem do número de UFCs de maneira dependente da dose, conforme mostrado na figura 16. Todos os dados foram divididos em fluxo de saída e fluxo de entrada do modelo renal. Após do ultrassom há liberação de 3 logs (UFC/mL) de bactérias da esponja nos testes de alta temperatura em relação ao controle, 2 logs (UFC/mL) em baixas temperaturas e 3,5 logs (UFC/mL) de *S. aureus* em temperatura ambiente, também mostrando crescimento uniforme em amostras de fluxo de entrada e saída.



Figura 16 - Inibição do crescimento de *S. aureus* na amostra após ultrassom. Temperatura Alta controle (T.A.C) e Temperatura alta irradiada (T.A.I) na cor preta; Temperatura baixa controle (T.B.C) e Temperatura baixa irradiada (T.B.I) em cinza Temperatura ambiente controle (T.Am.C) e Temperatura ambiente irradiada (T.Am.I) em vermelho.

O crescimento bacteriano observado após a coleta de amostra por esfregaço de *swab* feita na esponja (figura 17) mostra uma recuperação de 3-4 logs (UFC/mL) aproximadamente após o líquido ser irradiado por 4 h com luz UV-C. Também mostrando um crescimento uniforme nas amostras de fluxo de entrada e saída, exceto em temperatura ambiente irradiada na saída de fluxo que não apresenta crescimento bacteriano.



Figura 17 - Inibição do crescimento de S. *aureus* na amostra após Swab na esponja. Temperatura Alta controle (T.A.C) e Temperatura alta irradiada (T.A.I) na cor preta; Temperatura baixa controle (T.B.C) e Temperatura baixa irradiada (T.B.I) em cinza Temperatura ambiente controle (T.Am.C) e Temperatura ambiente irradiada (T.Am.I) em vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, foi observado o crescimento bacteriano após a coleta por *swab* feita na seringa que compôs o modelo renal (figura 18), mostra uma recuperação de 3-4 logs (UFC/mL) aproximadamente após o líquido ser irradiado por 4 h com luz UV-C nas diferentes temperaturas na entrada do fluxo e também mostra uma recuperação de 2-3 logs (UFC/mL) aproximadamente nas diferentes temperaturas na saída do fluxo. O crescimento é uniforme nas amostras do fluxo tanto na entrada como na saída,

exceto em temperatura ambiente irradiada na saída de fluxo que apresenta o menor crescimento bacteriano.



Figura 18 - Inibição do crescimento de *S. aureus* na amostra após Swab na seringa. Temperatura Alta controle (T.A.C) e Temperatura alta irradiada (T.A.I) na cor preta; Temperatura baixa controle (T.B.C) e Temperatura baixa irradiada (T.B.I) em cinza Temperatura ambiente controle (T.Am.C) e Temperatura ambiente irradiada (T.Am.I) em vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao analisar todos os resultados deste capítulo, se observa que permanecem microrganismos retidos no modelo renal. Ao passar o líquido circulante que está sendo descontaminado pelo sistema de UV-C, ocorre a liberação de mais microrganismos no líquido conforme a concentração microbiológica diminui. Porém, a eliminação de microrganismos ocorre mais rapidamente que a liberação dos microrganismos retidos. Então temos a variação da concentração microbiana depende da dose:

$$\frac{dC\mu}{dD} = -\Upsilon C_{\mu} + L(D) \tag{4.1}$$

onde C<sub>µ</sub> é a carga microbiana em solução,  $\gamma$  é uma constante  $\gamma = \left(\frac{1}{D_0}\right)$  e L(D) é a taxa de liberação que também depende da dose (pois a liberação depende da quantidade de microrganismos eliminados).

Ocorre que pelo demostrado, o que se está eliminando (- $\gamma C_{\mu}$ ) é inicialmente maior do que o liberado (L), ou seja, eliminação supera a liberação e, portanto, há decaimento. Porém como a liberação é baixa, muitos microrganismos ficam retidos no reservatório do modelo de rim. Isto mostra que a dinâmica de liberaçãoeliminação precisa ser melhor balanceada. Isto é necessário já que o alvo da descontaminação é o órgão e apenas a descontaminação da solução não é um resultado satisfatório.

Por outro modo, temos que as bactérias, devido à sua sensibilidade aos antibióticos, foram capazes de desenvolver estratégias para sobreviver e uma delas é a formação de biofilmes, onde S. aureus é uma espécie líder.<sup>51-52</sup> Esses biofilmes ajudam esses microrganismos a aderir às superfícies e resistir a ameacas ambientais, desinfetantes químicos e até a radiação UV que danifica as células.<sup>53</sup> A determinação desses tipos de fatores ou condições bacterianas é importante quando se utiliza ferramentas de descontaminação, como irradiação UV, para inativar patógenos. Estudos como os de Bae e Lee<sup>54</sup> demonstram que para inativar 2 ou 3 log (UFC/mL) de cepas de bactérias como Escherichia coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes e Staphylococcus aureus inoculados na forma de biofilmes em superfícies de polipropileno e aço inoxidável, são necessários mais de 1 J/cm<sup>2</sup>, enquanto no estudo de Hadjok et al.,<sup>55</sup> para desativar a mesma quantidade de log (UFC/mL) de Salmonella pulverizada em alface, sem a presença de biofilmes, foram necessários aproximadamente 0,038  $J/cm^2$ . Embora sejam experimentos com diferentes delineamentos experimentais, seu objetivo acaba sendo o mesmo, mostrando a importância quanto ao fato de esses microrganismos serem ou não protegidos por biofilmes.

Finalmente, as bactérias geralmente preferem crescer nas superfícies de substratos disponíveis, com condições ideais para seu habitat a crescer em fases aquosas.<sup>56</sup> Esse mecanismo de seleção está envolvido com a adesão bacteriana e é um processo complexo porque envolve muitos fatores, como fatores ambientais,

condições de fluxo associadas, presença de proteínas ou antibióticos séricos, propriedades bacterianas, características da superfície do material, entre outros,<sup>57</sup> o que explica os desafios encontrados pelo modelo de inativação deste estudo para reduzir a carga microbiana que permanece no órgão.

#### 4.4 Conclusão parcial

A descontaminação em líquidos com altas concentrações bacterianas continua tendo resultados satisfatórios em tempos curtos de irradiação, mas as colônias de *S. aureus* que ficaram retidas no modelo experimental de rim não estão sendo eliminadas. Esse resultado pode estar relacionado com parâmetros como a intensidade do fluxo e a aderência das bactérias nas paredes ou poros do modelo. Por outro lado, a retenção de microrganismos pelo modelo de rim mostra que, uma vez que a liberação é lenta, o processo de descontaminação do "órgão" ainda não é eficiente. O aumento da temperatura parece facilitar a liberação (figura 19), porém não é conveniente para preservação. Será necessário investigar formas de aceleração de liberação de microrganismos em estudos futuros.



Figura 19 – Redução de microrganismos nas diferentes temperaturas testadas do líquido de preservação.

#### 5 Perfusão e descontaminação *ex vivo* de rim de porco

Finalmente, este capítulo contém os procedimentos e resultados de experimentos realizados com rins de porco *ex vivo*, que foram contaminados por *S. aureus* e descontaminados por irradiação por UV-C durante seu processo de perfusão.

# 5.1 Objetivos específicos

 Avaliar a capacidade de descontaminação da solução de preservação circulando pelo rim de porco *ex vivo* infectado por meio de irradiação com luz ultravioleta-C (UV-C) em 254 nm.

# 5.2 Metodologia

Se apresenta na figura 19, de modo geral a metodologia que será explicada nos seguintes itens.

# 5.2.1 Microrganismo

As bactérias S. aureus foram preparadas seguindo a descrição 3.2.1.

# 5.2.2 Sistema de descontaminação

Ver descrição 3.2.2. O sistema de descontaminação foi adaptado em uma máquina de perfusão renal fornecida pela "Organ Recovery Systems". Para ter sucesso na conexão do sistema na máquina, foram realizados furos no cassete ou circuito de perfusão da máquina (figura 7, parte 2) que permitiram a troca de líquido entre o sistema de descontaminação e a máquina sem afetar o processo de perfusão.



Figura 20 – Metodologia geral de contaminação e descontaminação *ex vivo* de rim de porco. Fonte: Elaborada pela autora.

# 5.2.3 Contaminação e descontaminação de S. aureus no líquido de preservação, durante a perfusão de um rim suíno.

Para corroborar as experiências *in vitro* realizadas de descontaminação para o líquido circulante, foi realizada a contaminação do Custodiol, uma perfusão e descontaminação do rim suíno. Inicialmente, um rim fresco de porco com um peso aproximado de 100 g (figura 21), provido de um matadouro, foi canulado na veia porta e no manguito aorto-celíaco e heparinizado com 25000 UI de heparina sódica, 30 minutos após sua extração, foi colocado e conectado em uma máquina de perfusão renal "Lifeport Kidney Transporter" com 1 L de soro fisiológico. A máquina

de perfusão foi mantida configurada e monitorada com valores aproximados de temperatura a 2°C – 4°C, pressão de 30 mmHg, fluxo de 40 mL/min e resistência de 0,70 mmHg/(mL/min).



Figura 21 – Rim de porco perfundido. Fonte: Elaborada pela autora.

Antes da infusão, houve uma série de problemas devido à difícil canulação do órgão e a pouca experiência de nosso grupo nesse processo, atrasando o processo de perfusão 1 h após a extração do rim.

A infusão foi realizada diretamente, 4 horas após a heparinização do rim, a solução sérica heparinizada foi trocada por Custodiol e 3 mL de inóculo de 8 log (UFC/mL) de *S. aureus* que foram preparados previamente. Logo depois se deixou em perfusão por 1 hora para garantir a contaminação do rim. Após 1 hora, uma amostra do líquido circulante foi coletada no tempo zero e o sistema descontaminador com fonte de luz UV-C foi ligado à máquina Lifeport (figura 22) que não alterou a perfusão do órgão. Em seguida, as amostras foram coletadas nos momentos 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 minutos de perfusão e descontaminação por UV-C, para então fazer uma diluição em série e plaqueamento das amostras em placas de Petri. Finalmente, foi realizado um rim macerado e foram coletadas 3 amostras, que foram

diluídas para determinar a quantidade de *S. aureus* que permaneceu no órgão após a irradiação. As amostras foram incubadas por 24 horas a uma temperatura de 37 °C para realizar subsequentemente a contagem bacteriana.



Figura 22 - Sistema de descontaminação de rim porcino. a) maquina Lifeport, b) fonte de luz UV-C, c) bomba peristáltica.

Fonte: Elaborada pela autora.

# 5.2.4 Testes para determinar alterações no líquido de preservação Custodiol<sup>®</sup> ou HTK

As amostras do líquido de preservação irradiado durante a perfusão do órgão para os testes de absorbância e citotoxicidade em células foram preparadas seguindo a descrição 3.2.4.

Para realizar o espectro de absorbância, a amostra do líquido de preservação foi coletado após de 4 h de irradiação e para realizar o teste de citotoxicidade em células, as amostras do líquido de preservação foram coletadas nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h e 4 h de irradiação.

#### 5.3 Resultados e discussão

Nos resultados da contagem bacteriana, observa-se que nas amostras obtidas do líquido circulante, 5 log (UFC/mL) de *S. aureus* diminuíram 1,5 log após 90 minutos de irradiação e permaneceram até as 4 horas de irradiação (figura 23).



Figura 23 - Bactérias recuperadas da infecção com *S. aureus*. Crescimento de *S. aureus* durante as 4h de perfusão e irradiação UV-C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por outro lado, antes e depois do processo de contaminação e descontaminação do líquido de preservação de órgãos, amostras foram coletadas para comprovar a eficácia da contaminação por *S. aureus* e descontaminação do rim, resultados apresentados na figura 24. O gráfico mostra a quantidade de *S. aureus* recuperada do inóculo inicial com mais de 8 log (UFC/mL) de bactérias, a solução de preservação de órgão (Custodiol<sup>®</sup>) que não apresentou contaminação nenhuma já

que era estéril. Continuando, a figura também mostra as amostras dos líquidos coletadas no tempo 0 (Zero) após da contaminação com bactérias com 4.5 log (UFC/mL) e depois de 1 h de circulação com bactérias sem irradiação com mais de 5 log (UFC/mL) de bactérias recuperadas. Outro resultado importante da figura 24 é a quantidade de *S. aureus* que o órgão libera após da troca do líquido contaminado por líquido de preservação novamente estéril, recuperando 5 log (UFC/mL) de contaminação. Finalmente, mostra o resultado da maceração do rim, após de 4 h de irradiação com UV-C, com 4.5 log (UFC/mL) de bactérias recuperadas, ou seja, o sistema de perfusão não é eficiente para ajudar a remover as bactérias que estão dentro dos tecidos do órgão.



Figura 24 - Bactérias recuperadas da infecção com S. aureus no líquido. O inóculo inicial de S. aureus, HTK é a amostra estéril do líquido de perfusão, T0 é a amostras de HTK inicial com bactéria S. aureus, 1h é o HTK com bactéria S. aureus após 1h de infusão, HTK trocado é a amostra do líquido de preservação nova trocada no sistema para continuar a perfusão do rim e No rim corresponde as amostras maceradas após da descontaminação.

Analisando o comportamento dos dados na figura 23, se a taxa de variação da carga microbiana  $C_{\mu}$  como função da dose D é dada por:

$$\frac{dC_{\mu}}{dD} = -\Upsilon C_{\mu} + L(D) \tag{5.1}$$

onde  $\gamma$  é uma constante ( $\gamma = \frac{1}{D_0}$ ), que representa o que se está eliminando pela descontaminação (- $\gamma = C_{\mu}$ ), e L(D) é a liberação de microrganismos pelo tecido que também depende da dose (quanto maior a eliminação pela irradiação, maior a liberação pelo tecido), ocorre que a taxa de liberação se iguala ao poder de eliminação. Neste ponto

$$\frac{dC_{\mu}}{dD} \cong 0 \tag{5.2}$$

ou seja,

$$\Upsilon C_{\mu}^{estacionaria} \sim L(D)$$
 ou  $\Upsilon C_{\mu}^{estacionaria} \sim 10^{3} UFC/mL$ 

onde o valor de C<sub>µ</sub><sup>estacionaria</sup> ~ 10<sup>3</sup> UFC/mL, esse valor foi estimado a partir do resultado de redução microbiana da figura 23 e sendo  $\gamma$  uma constante ( $\gamma = \frac{1}{D_0} \sim 12,5$  J/cm<sup>2</sup>).

Com isto, chegamos a uma taxa de liberação da ordem de:

$$L \sim 1,25 \ 10^4 \frac{(UFC \ cm^2)}{(J \ mL)}$$
(5.3)

É importante notar que, com esta liberação e com a entrega de 8 J/cm<sup>2</sup> em 4 h, o tempo para eliminação seria muito superior às 4 h do experimento.

De fato, ao olharmos a curva da figura 23, nota-se uma diminuição de solução de ordem de 0,5 log (UFC/mL) em 3 h. Isto mostra que para zerar a carga microbiana de 3 log (UFC/mL) seria necessária aproximadamente 18 h. Isto claramente mostra a necessidade de acelerar a liberação.

Finalmente, de forma geral, os resultados desse estudo mostraram que há uma série de parâmetros que devem ser estudados e controlados detalhadamente para o sucesso da técnica em qualquer experimento ou processo de descontaminação, como a qualidade das soluções que envolve o aparecimento de substâncias dissolvidas ou em suspensão que interferem na transmissão da luz UV ou na absorção da luz irradiada pela bactéria, exigindo mais tempo de exposição na amostra e diminuindo a eficácia do tratamento.<sup>58-63</sup> As condições das lâmpadas, a limpeza do tubo de quartzo e o tempo de uso adequado da lâmpada são fatores que podem interferir na dose de UV, entre outros parâmetros.

Como foi mencionado anteriormente, a dose é um fator importante nessa técnica, pois as bactérias podem sofrer um mecanismo conhecido como reparo<sup>64-69</sup> que determina as taxas de inativação bacteriana. A taxa de inativação é altamente dependente do microrganismo e do meio a ser irradiado; estudos mostram que, com apenas 1 minuto de radiação UV-C e com uma dose de 0,78 J/cm<sup>2</sup>, é possível desativar 6,5 log (UFC/mL) *de S. aureus*, 6,7 log (UFC/mL) de *S. mutans*, 6,2 log (UFC/mL) de *S. pneumoniae*, 5,4 log (UFC/mL) de *E. coli*, 5,2 log (UFC/mL) de *E. coli* (ATCC 8739), 5,4 log (UFC/mL) de *P. aeruginosa* e 6,7 log (UFC/mL) de *C. albicans* planctônicas.<sup>70-71</sup>

Em outros estudos, foi necessário mais tempo de irradiação (30 min) para reduzir logs de 1,7 (UFC/mL) com uma dose de 0,78 J/cm<sup>2</sup> ou aumentar a dose (23 J/cm<sup>2</sup>) para reduzir 2,5 log (UFC/mL) de bactérias como *S. aureus* em meios onde a luz não penetra uniformemente.<sup>70</sup> Wright *et al.*, (2000)<sup>72</sup> examinaram a eficácia da luz UV na redução de *E. coli* em cidra de maçã. Para seus estudos, um modelo CIDER-10uv (Ideal Horizons, Poultney, VT) foi usado para administrar doses variando de 0,094 a 0,061 J/cm<sup>2</sup>. Esta unidade empregada tinha 10 câmaras UV individuais conectadas em série, através das quais a cidra de maçã era bombeada como uma película fina. O tratamento com UV reduziu significativamente o patógeno com uma redução média de 3,81 log (UFC/mL).<sup>72</sup>

Adicionalmente, Wallace *et al.*, (2019) reduziram aproximadamente 1,5 log (UFC/mL) de *S. aureus* resistente à meticilina em PBS com soro bovino fetal para simular fluidos corporais na dose de 0,06286 J/cm<sup>2</sup>.<sup>73</sup> Gora *et al.*, (2019)<sup>74</sup> inativaram 1,3 log (UFC/mL) de *P. aeruginosa* ligada ao biofilm com doses de UV de 0,08 J/cm<sup>2</sup> e
finalmente, Di Bernardo e Dantas, em 2005, publicaram as diferentes doses necessárias de luz UV para inativar microrganismos patogênicos em humanos.<sup>75</sup>

Garantir que cada um dos microrganismos receba a dose de radiação necessária para ser eliminada se torna um desafio e um problema que deve ser minimizado. Nesse caso, falamos sobre o perfil do fluxo de soluções que desempenham um papel importante no processo. Neste estudo, é implementado um sistema de fluxo contínuo de 200 mL/min. Comparando com a literatura, Wright *et al.*, (2000) avaliaram a redução logarítmica de *E. coli* usando várias taxas de fluxo, variando de 1,0 a 6,5 L/min, correspondendo a uma uma redução média de 3,81 log (UFC/mL).<sup>72</sup> No estudo de Guerrero *et al.*, (2005), Os log<sub>10</sub> de redução obtido após 30 min de tratamento com UV foi de 1,34, 4,29 e 5,10 para *S. cerevisiae*, *L. innocua* e *E. coli*, respectivamente, na taxa de fluxo mais alta (0,548 L/min).<sup>76</sup> E um fluxo contínuo de 100 mL/L ajuda a inativar 1,3 log (UFC/mL) de *P. aeruginosa* vinculado ao biofilme.<sup>73</sup>

A dose de UV é inversamente proporcional à taxa do fluxo. Isso significa que quanto maior a taxa de fluxo através do sistema UV, menor o tempo de exposição dos microrganismos à luz UV e, portanto, menor a probabilidade de ser atingido pela luz UV.<sup>76</sup> Aumentar o tempo de recirculação ou número de ciclos, pode aumentar a probabilidade de microrganismos serem atingidos pela luz UV.<sup>72</sup> Ainda assim, os dados variam de acordo com o equipamento usado para a desinfecção por UV, bem como a natureza do líquido que está sendo tratado. Por esse motivo, seria sensato investigar a eficácia do UV para uso em uma situação específica.<sup>77</sup> Além disso, a mudança de um perfil de fluxo laminar a perfil para um perfil de turbulência do líquido no sistema pode aumentar a inibição microbiana, expondo mais partes do líquido à luz UV.<sup>76-78</sup>

Para investigar as alterações no líquido, uma amostra do líquido de preservação (custodiol<sup>®</sup>) foi coletada e analisada no espectro de absorbância na região de 270 e 500 nm (figura 25), mostrando pouca degradação, alteração na banda larga do líquido após de 4 h de irradiação.



Figura 25 - Espectro de absrbância do Custodiol® irradiado após a perfusão do órgão. Fonte: Elaborada pela autora.

Por outro lado, também foram feitos testes de toxicidade, para saber se o UV-C causava alguma alteração em células. Foi utilizado como controle fibroblastos (HDFn) com o meio ideal de cultura para as células, uma amostra do líquido de preservação (Custodiol<sup>®</sup> HTK) (sem irradiação), e as amostras de líquido irradiadas durante a circulação pelo sistema de descontaminação foram coletadas cada uma hora até completar 4 h de descontaminação. As amostras foram depositadas numa placa de 96 poços colocadas para incubar em temperaturas de 4° C, mantendo a temperatura do líquido de preservação utilizado durante a perfusão (Figura 26).



Figura 26 - Citotoxicidade do líquido de preservação (Custodiol® HTK) em fibroblastos durante 4 h de perfusão do órgão.

## Fonte: Elaborada pela autora

A figura 26 mostra a absorbância das diferentes amostras do líquido de preservação irradiado nos diferentes tempos. Com relação ao controle, as amostras coletadas durante as duas primeiras horas de irradiação e inoculadas nas células apresentaram maior viabilidade. Após da terceira e quarta hora de irradiação com UV-C foi diminuindo a 1 que é o valor da absorbância que apresentou a amostra de fibroblastos em meio ideal. Pelo Custodiol<sup>®</sup> ser uma solução apropriada para baixas temperaturas, a viabilidade foi até maior que com o meio da cultura.

Estes estudos mostraram que as alterações são pequenas, não causando no tempo considerado alterações e nem toxicidade à célula.

## 5.4 Conclusão parcial

Ao avaliar os protocolos de contaminação renal e descontaminação de fluido circulante em experimentos *ex vivo*, a perfusão de um rim de porco foi realizada por quatro horas, onde o líquido de perfusão (custodiol) foi inicialmente contaminado e depois irradiado com luz UV-C para inativação bacteriana. Foi possível reduzir a carga bacteriana circulante no líquido de preservação em 60%, embora, o 75% de log (UFC/mL) de *S. aureus* inoculado após a maceração de órgãos foi recuperado, mostrando que esse modelo não é suficiente para reduzir efetivamente a carga bacteriana no rim.

## 6 Conclusão

O presente trabalho foi desenvolvido para testar diferentes maneiras de contaminar e diminuir ou eliminar a carga bacteriana de *S. aureus, in vitro* e *ex vivo*, através do líquido circulante durante a perfusão dos rins, com a ajuda da técnica de irradiação óptica de luz UV-C. *S. aureus* é uma bactéria de grande importância devido à sua ampla variedade de manifestações de doenças nosocomiais e é fácil se tornar resistente a antibióticos,<sup>30-31</sup> o que torna sua importância no estudo.

Com a realização deste estudo se conseguiu desenhar um modelo de contaminação e descontaminação de rim circulante eficiente, o uso de uma técnica óptica como é o caso da irradiação ultravioleta-C especificamente no comprimento de onda de 254 nm teve um papel muito importante na inativação de microrganismos no líquido circulante.

Durante 4 horas de irradiação foi possível a redução do 100% da carga microbiana no líquido, sem as barreiras oferecidas por estruturas complexas como o próprio órgão. Durante a perfusão do rim se conseguiu a redução do 99% da carga microbiana no líquido de preservação, o que corresponde à redução de 2 log (UFC/mL) de *S. aureus* aproximadamente, resultados satisfatório mas que também revelou as limitações da técnica na descontaminação do próprio órgão com os parâmetros estabelecidos durante o desenho do modelo.

As limitantes neste trabalho de forma geral são as baixas taxas de liberação dos microrganismos presentes no tecido do órgão para circulação no sistema. Esta liberação poderia se beneficiar de processos físicos como a aplicação de ultrassom no próprio rim, por meio de um dispositivo sonicador adaptado ao recipiente que hospeda o órgão, não alterando a viabilidade do órgão já que nos resultados apresentados no capítulo 2 deste trabalho observa-se liberação extra de carga microbiana após aplicação de ultrassom feita no modelo experimental de rim isolado (esponja). Outra limitante potencial para o efeito desejado pode ter sido a turbidez provocada pelo sangue do órgão no líquido de preservação circulante que poderia bloquear a ação da UV-C. Este problema poderia ser reduzido em estudos futuros com filtros colocados antes do líquido passar pela fonte descontaminadora, de modo a reduzir a turbidez provocada pelos partículas sanguíneas.

O estudo revelou que, ainda que haja desafios a sobrepujar, o uso da técnica é promissor para o processo de descontaminação de líquido de preservação de órgão circulante durante a perfusão e em posteriores estudos se tentará procurar alternativas juntos com a irradiação UV-C para aumentar a eficácia do processo de descontaminação do órgão sob perfusão.

## REFERÊNCIAS

1 KOSKELLA, B.; THOMPSON, J. N.; PRESTON, G. M.; BUCKLING, A. Local biotic environment shapes the spatial scale of bacteriophage adaptation to bacteria. *American Naturalist*, v. 177, n. 4, p. 440-451, 2011.

2 JUN, S.; SI, F.; PUGATCH, R.; SCOTT, M. Fundamental principles in bacterial physiology—history, recent progress, and the future with focus on cell size control: a review. *Reports on Progress in Physics*, v. 81, n. 5, p. 056601, 2018.

3 SCIENCEDAILY. *How bacteria respond so quickly to external changes*. Disponível em: www.sciencedaily.com/releases/2013/12/131202161952.htm. Acesso em: 21 dez. 2020.

4 SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto-Enfermagem*, v. 13, n. Spe, p. 64-70, 2004. DOI: 10.1590/S0104-07072004000500007.

5 CHANG, J. C. *et al.* UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, n.6, p. 1361-1365, 1985.

6 KASAHARA, I.; CARRASCO, V.; AGUILAR, L. Inactivation of Escherichia coli in goat milk using pulsed ultraviolet light. *Journal of Food Engineering*, v. 152, p. 43-49, 2015. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.11.012.

7 HERNÁNDEZ, D. *et al.* Mortalidad en lista de espera para trasplante renal. *Nefrología*, v. 35, n. 1, p. 18-27, 2015.

8 GALASSO, M. *et al.* Inactivating hepatitis C virus in donor lungs using light therapies during normothermic ex vivo lung perfusion. *Nature Communications*, v. 10, p. 481, 2019. DOI: 10.1038/s41467-018-08261-z.

9 O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014. (Review on antimicrobial resistance) Disponível em: https://amrreview.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-

%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20n ations\_1.pdf. Acesso em: 23 jan. 2020.

10 REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES (RBT). *Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2012-2019)*. 2019. Disponível em: http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2019/RBT-2019-leitura.pdf. Acesso em: 23 jan. 2020.

11 SINGH, N. Nosocomial Infection in solid organ transplant recipients. *In*: MAYHALL, C. G. (ed.). *Hospital epidemiology and infection control*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 985–1010.

12 MARINHO, B. *et al.* Prevalência de doença renal crônica em adultos no Brasil: revisão sistemática da literatura. *Cadernos Saúde Coletiva*, v. 25, n. 3, p. 379, 2017.

13 KAVIANI, A.; INCE, D.; AXELROD, D. A. Management of antimicrobial agents in abdominal organ transplant patients in intensive care unit. *Current Transplantation Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2020.

14 LEN, O. *et al.* Recommendations for screening of donor and recipient prior to solid organ transplantation and to minimize transmission of donor-derived infections. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, p. 10-18, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12557.

15 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.* 2017. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed. Acesso em: 23 jan. 2020.

16 VELOSO, A. C. R.; FINK, H. T. K.; LIMA, L. M. P. D. Resistência genotípica do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 aos antirretrovirais. *Comunicação em Ciências da Saúde*, v. 21, n. 1, p. 49-59, 2010.

17 HELMUT G. R.; BRADLEY, M. D. *Renal pathophysiology*: the essentials. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.

18 RAYNER, H.; THOMAS, M.; MILFORD, D. Kidney anatomy and physiology. *In*: RAYNER, H.; THOMAS, M.; MILFORD, D. (ed.). *Understanding kidney diseases*. 2nd ed. Cham: Springer, 2016. p. 1-9.

19 NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. *Los riñones y cómo funcionan*. Disponível em: https://www.niddk.nih.gov/-/media/Files/Spanish-Kidney/YourKidneys-SP\_508.pdf. Acesso em: 02 abr. 2020.

20 BELZER, F.; ASHBY, B. S.; DUNPHY, J. E. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. Lancet, v. 290, n. 7515, p. 536-539, 1967.

21 ESCALANTE COBO, J. L.; RÍO GALLEGOS, F. D. Preservación de órganos. *Medicina Intensiva*, v. 33, n. 6, p. 282-292, 2009.

22 PENG, P. *et al* Hypothermic machine perfusion versus static cold storage in deceased donor Kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Artificial Organs*, v. 43, n. 5, p.478-489, 2018.

23 KATARIA, A.; MAGOON, S.; MAKKAR, B.; GUNDROO, A. Machine perfusion in kidney transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, v. 24, n.4, p. 378-384, 2019.

24 PENICK, F. J.; SIERRA, J. M.; GONZÁLEZ, E. R.; RESEL, L.; MOYANO, A. S.; FAJARDO, G. B. Conservación de órganos. *Clínicas Urológicas de la Complutense*, v.7, p. 209, 1999.

25 LIFEPORT KIDNEY TRANSPORTE. *Manual do operador 1.0.* Disponível em: https://4fetz713plu53drexe2d10ht-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2019/12/755-00029pt-Rev-J-LKT100-Operators-Manual.pdf. Acesso em: 30 out. 2020.

26 KATHS, J. M. *et al.* Continuous normothermic ex vivo kidney perfusion improves graft function in donation after circulatory death pig kidney transplantation. *Transplantation*, v. 101, n. 4, p. 754-763, 2017.

27 SOUTHARD, J. H.; BELZER, F. O. Organ preservation. *Annual Review of Medicine*, v. 46, n. 1, p. 235-247, 1995.

28 GUIBERT, E. E. *et al.* Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 38, n. 2, p. 125-142, 2011.

29 LEITE, R. R. A. *et al.* Machine perfusion versus cold storage in renal preservation of deceased donors with brain death: systematic review and meta-analysis. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 46, n. 2, p. e2079, 2019.

30 SANTOS, A. L. D. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

31 CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of Staphylococcus aureus? *Emerging Infectious Diseases*, v. 7, n. 2, p. 178, 2001.

32 ZENDEJAS-MANZO, G. S.; AVALOS-FLORES, H.; SOTO-PADILLA, M. Y. Microbiología general de Staphylococcus aureus: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, v. 25, n. 3, p. 129-143, 2014.

33 FOX, J. *et al.* (ed.). *The mouse in biomed research*: diseases. 2nd ed. New York: Academic Press; 2007.

34 BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p.732-742, 2011.

35 KANELLIS, V. G. Ultraviolet radiation sensors: a review. *Biophysical Reviews*, p. 895, 2019. DOI: 10.1007/s12551-019-00556-9.

36 SAEED, S., DEB, N.; VARGHESE, L.; THORNHILL, B.; AL-SHAIKH, I.; WARREN, C. Toxicity to residual chlorine: comparison of sensitivity of native Arabian Gulf species and non-native species. *International Journal of Scientific Research in Environmental Science and Toxicology*, v.4, n.1, p. 1-11, 2019.

37 VIG, J. R. UV/ozone cleaning of surfaces. *Journal of Vacuum Science & Technology A*: vacuum, surfaces, and films, v. 3, n. 3, p. 1027-1034, 1985. DOI: 10.1116/1.573115

38 ASHLEY, J.; RASOOLY, J. A.; TRAN, I.; YOST, L. E.; CHERTOW, G. M. Effect of UV light on disinfection of peritoneal dialysis catheter connections. *Peritoneal Dialysis International*, v.37, n. 1, p. 109-111, 2017.

39 NARITA, K.; ASANO, K.; MORIMOTO, Y.; IGARASHI, T.; HAMBLIN, M. R.; DAI, T.; NAKANE, A. Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillinresistant Staphylococcus aureus infection in mouse wounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*: biology, v. 178, p. 10-18, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.030.

40 WELCH, D.; BUONANNO, M.; SHURYAK, I.; RANDERS-PEHRSON, G.; SPOTNITZ, H. M.; BRENNER, D. J. Effect of far ultraviolet light emitted from an optical diffuser on methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro. *PLoS ONE*, v. 13, n. 8, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0202275.

41 FERRICCIONI, N.; MATEUCCI, R.; ZANGRANDO, A.; SANTANA, S.; CAMPOS, C. A. Effect of decontamination treatment on the quality of dehydrated thyme,

coriander, and mustard. *Food Science and Technology International*, v. 25, n. 7, p. 579-587, 2019.

42 OVIEDO, G. A. L.; NAVARRO, M. C.; ALTAMIRANDA, J. A. Estudio de fotoreactivación en cultivos microbiológicos obtenidos de carga microbiana de la superficie de fresas sometidas a diferentes dosis de luz ultra violeta de onda corta UV-C. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, v. 5, n. 1, p. 32-40, 2018.

43 SVISTAK, I. Aplicação de luz UVC para diminuição da carga microbiana em cenoura minimamente processada. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

44 PADILLA TORRES, C. A. Comparación del uso de radiación UV-C y ozono sobre la calidad fisicoquímica de tomate de árbol (Solanum betaceum) mínimamente processado. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, 2017.

45 SHARMA, R. R.; DEMIRCI, A. Inactivation of Escherichia coli O157: H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 4, p. 1448-1453, 2003.

46 GONÇALVES, R. F. *et al. Desinfecção de efluentes sanitários.* Rio de Janeiro: ABES, 2003.

47 BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry–a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 6, p. 637-645, 2000.

48 LÓPEZ DÍAZ, A. S.; PALOU, E.; LÓPEZ MALO, A. Radiación ultravioleta en jugos de frutas: fundamentos y aplicaciones. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, v. 6, n. 2, p. 79-93, 2012.

49 PANTOJA-ESPINOZA, J. C.; PROAL-NÁJERA, J. B.; GARCÍA-ROIG, M.; CHÁIREZ-HERNÁNDEZ, I.; OSORIO-REVILLA, G. I. Eficiencias comparativas de inactivación de bacterias coliformes en efluentes municipales por fotolisis (UV) y por fotocatálisis (UV/Tio2/Sio2). caso: depuradora de aguas de Salamanca, España. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 14, n. 1, p. 119-135, 2015.

50 AMASINO, A. J.; BLANCO, M. F.; MIRANDA, R.; OLIVERA, D.; CÁRDENAS, F. C. Aplicación de luz UVC para esterilizar soluciones parenterales./Application of UVC light to sterilize parenteral solutions. *Ciencia Veterinaria*, v. 20, n. 2, p.13-26, 2019.

51 BRYERS, J. D. Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, n. 1, p. 1-18, 2008.

52 RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012.

53 GORA, S. L.; RAUCH, K. D.; ONTIVEROS, C. C.; STODDART, A. K.; GAGNON, G. A. Inactivation of biofilm-bound Pseudomonas aeruginosa bacteria using UVC light emitting diodes (UVC LEDs). *Water Research*, v. 151, p. 193–202, 2019. DOI:10.1016/j.watres.2018.12.021.

54 BAE, Y.-M.; LEE, S.-Y. Inhibitory effects of UV treatment and a combination of UV and dry heat against pathogens on stainless steel and polypropylene surfaces. *Journal of Food Science*, v. 77, n. 1, p. M61–M64, 2011. DOI:10.1111/j.1750-3841.2011.02476.x.

55 HADJOK, C.; MITTAL, G. S.; WARRINER, K. Inactivation of human pathogens and spoilage bacteria on the surface and internalized within fresh produce by using a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 4, p. 1014–1024, 2008. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03624.x.

56 RIJNAARTS, H. H. M.; NORBE, W.; BOUWER, E. J.; LYKLEMA, J.; ZEHNDER, A. J. B. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B*: biointerfaces, v. 4, p. 5-22, 1995.

57 KATSIKOGIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions. European Cells & Materials Journal, v. 8, n. 3, p. 37-57, 2004.

58 WHITBY, G. E.; PALMATEER, G. The effect of UV transmission, suspended solids and photoreactivation on microorganisms in wastewater treated with UV light. *Water Science and Technology*, v. 27, n. 3-4, p. 379-386, 1993.

59 CARNIMEO, D.; CONTINI, E.; DI MARINO, R.; DONADIO, F.; LIBERTI, L.; RANIERI, E. Wastewater disinfection by UV at Trani municipal plant. *Water Science and Technology*, v. 30, n. 4, p. 125, 1994.

60 TERPSTRA, F.G. *et al.* Potential and limitation of UVC irradiation for the inactivation of pathogens in platelet concentrates. *Transfusion*, v. 48, n. 2, p. 304–313, 2008.

61 MOHR, H. *et al.* Inactivation of pathogens in single units of therapeutic fresh plasma by irradiation with ultraviolet light. *Transfusion*, v. 49, n. 10, p. 2144–2151, 2009.

62 KOUTCHMA, T. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, v. 2, n. 2, p. 138-155, 2009.

63 JENNY, R. M. *et al.* Heuristic optimization of a continuous flow point-of-use UV-LED disinfection reactor using computational fluid dynamics. *Water Research*, v. 83, p. 310-318, 2015. DOI: 10.1016/j.watres.2015.06.031.

64 LEHNINGER, A. L. et al. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2000.

65 JAGGER, J. Introduction to research in ultraviolet photobiology. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 1967.

66 YAJIMA, H. *et al.* A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. *EMBO Journal*, v.14, n. 10, p. 2393-2399, 1995.

67 LILTVED, H.; LANDFALD, B. Effects of high intensity light on ultraviolet- irradiated and non-irradiated fish pathogenic bacteria. *Water Research*, v. 34, n. 2, p. 481-486, 2000.

68 STEVENS, C. *et al.* The germicidal and hormetic effects of UV-C light on reducing brown rot disease and yeast microflora of peaches. *Crop Protection*, v. 17, n. 1, p. 75-84, 1998.

69 SASTRY S. K.; DATTA, A. K.; WOROBO, R. W. Ultraviolet light. *Journal Food Science*, v. 65, n. S8, p. 90–92, 2000.

70 CORRÊA, T. Q.; BLANCO, K. C.; INADA, N. M.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Optical techniques for the microbiological control of blood. *In*: INTERNATIONAL PHOTODYNAMIC ASSOCIATION WORLD CONGRESS, 17., 2019, Cambridge. *Proceedings* [...]. Cambridge: SPIE, 2019.

71 CORRÊA, T. Q. *et al.* Manual operated ultraviolet surface decontamination for healthcare environments. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 35, n. 12, p. 666, 2017.

72 WRIGHT, J. R.; SUMNER, S. S.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.; ZOECKLEIN, B. W. Efficacy of ultraviolet light for reducing Escherichia coli O157:H7 in unpasteurized apple cider. *Journal of Food Protection*, v. 63, n. 5, p. 563–567, 2000.

73 WALLACE, R. L.; OUELLETTE, M.; JEAN, J. Effect of UV-C light or hydrogen peroxide wipes on the inactivation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, clostridium difficile spores and norovirus surrogate. *Journal of Applied Microbiology*, v. 127, n. 2, p. 586-597, 2019.

74 GORA, S. L.; RAUCH, K. D.; ONTIVEROS, C. C.; STODDART, A. K.; GAGNON, G. A. Inactivation of biofilm-bound Pseudomonas aeruginosa bacteria using UVC light emitting diodes (UVC LEDs). *Water Research*, v. 151, p. 193-202, 2019. DOI: 10.1016/j.watres.2018.12.021.

75 DI BERNARDO, L.; DANTAS, Â. D. B. Metodos e tecnicas de tratamento de agua. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 11, n. 2, p. 107-107, 2006.

76 GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Reduction of Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli and Listeria innocua in apple juice by ultraviolet light. *Journal of Food Process Engineering*, v. 28, n. 5, p. 437-452, 2005.

77 BACHMAN, R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. *The Brown Boveri Review*, v. 62, p. 206–209, 1975.

78 KOUTCHMA, T.; KELLER, S.; CHIRTEL, S.; PARISI, B. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 5, n. 2, p. 179-189, 2004.