

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

**Desenvolvimento e avaliação de um sistema automatizado
biosseguro para o tratamento, reciclagem e descarte de
resíduo de microbiologia clínica**

Alvaro Largura

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientador:
Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo
2007

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

L322d Largura, Álvaro
Desenvolvimento e avaliação de um sistema automatizado
biosseguro para o tratamento, reciclagem e descarte de resíduo
de microbiologia clínica / Álvaro Largura. -- São Paulo, 2007.
137p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador : Hirata, Mário Hiroyuki

1. Microbiologia clínica 2. Resíduo : Serviço de saúde :
Tratamento : Engenharia sanitária I. T. II. Hirata, Mário Hiroyuki
Orientador.

616.0756 CDD

**Desenvolvimento e avaliação de um sistema automatizado
biosseguro para o tratamento, reciclagem e descarte de
resíduo de microbiologia clínica**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita
1º. examinador

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
2º. examinador

Prof. Dr. Carlos Adalberto Camargo Sannazzaro
3º. examinador

Prof. Dr. JO Yoshikune Osugue
4º. Examinador

São Paulo, 01 de novembro de 2007

Acreditar nos sonhos sempre fez parte da minha vida e a coragem associada à autoconfiança, a vontade de fazer bem e melhor sempre foram às minhas angústias. A velocidade e a determinação inabalável nas soluções de problemas deixaram marcas que caracterizaram minha personalidade. Acredito em Deus e não acredito que os eventos acontecem por acaso.

Dedicatória

Aos meus familiares, Marleza, Emiliane, Clarissa Mara, Marco Antonio e às minhas irmãs, que acreditaram e incentivaram para o retorno a um curso acadêmico. E aqueles que me incentivaram para terminá-lo. À minha mãe e ao pai, que apesar da ausência, na simplicidade, foram os modeladores da nossa personalidade. Ensinaram o valor do trabalho, do compromisso com o outro e da honestidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata, um grande mestre e amigo, exemplo de homem do bem. Agradeço pela oportunidade da realização desta pesquisa e, mais ainda, pela liberdade de escolha do tema. Só aceitar o desafio para orientar um sexagenário, devo ressaltar a coragem do prof. Mário. Muito obrigado pelos ensinamentos transmitidos e pelas idéias: foram importantes na minha formação.

À Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata agradeço a paciência de escutar e de tentar entender as idéias ousadas e as sonhadoras teorias discursadas com entusiasmo.

Ao colega de trabalho Dr. Fabiano Sandrini, pelas sugestões, pelo auxílio técnico e teórico durante a fase experimental e pelo entusiasmo transmitido ao longo do trabalho.

Aos colegas Gilmar Belatto, Paulo S. Osorio, Alisson Marassi, Edmir Duarte Gonçalves e Liane Ferri que participaram ativamente na fase experimental.

Aos amigos João Paulo e Roberto Guimarães Andrade Junior, que acreditaram na idéia de um projeto audacioso, viabilizaram a construção do equipamento, trabalhando incansavelmente durante dois anos. À oficina Renz na cidade de Cascavel, Paraná, pela disposição em ceder gentilmente o espaço para os experimentos com o SADEMC.

À Elaine e ao Jorge, amigos e incentivadores, pelo pronto atendimento e préstimos oferecidos durante a elaboração do trabalho escrito.

A todos os colaboradores do Laboratório em Cascavel e aos colegas de pós-graduação, muito obrigado pelo companheirismo, pela colaboração e pela paciência manifestada em todos estes anos.

RESUMO

No Brasil, diariamente, são descartadas 2,3 toneladas de meios de cultura potencialmente contaminados com microorganismos. A resolução RDC N° 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza que os resíduos devem ser tratados antes do descarte, visando à redução da carga microbiana. Foram desenvolvidos 2 métodos para avaliar a sensibilidade e a eficiência, assim como a concentração ideal, de um agente químico (biocida) contra microorganismos contaminantes. O método de difusão com Perfurador Circular de Ágar (PCA) e o método com Perfurador Linear de Ágar (PLA) foram testados com 13 cepas de microorganismos. O biocida avaliado foi a combinação de hipoclorito de sódio (NaClO) com ácido acético (CH₃COOH). A partir destes resultados, foi desenvolvido um equipamento automatizado para processar a redução da carga microbiana (SADEMC) dos meios de cultura contaminados. A redução da carga microbiana foi avaliada pelo método quantitativo da reação da transcriptase reversa com detecção em tempo real. O método PCA mostrou ser reprodutível e eficiente para medir a inibição do crescimento bacteriano de um biocida. A concentração mínima de biocida capaz de reduzir o crescimento microbiano foi de 250 ppm para a solução aquosa de NaClO a 0,25% e de 200 ppm para a de CH₃COOH a 0,2%. No SADEMC, foi possível processar 4,6kg de meios de culturas em 100 litros da concentração mínima eficaz do biocida por 15 minutos, e atingir uma redução da carga microbiana de, aproximadamente, 1,4E10 unidades formadoras de colônias. Podemos concluir que o SADEMC promove uma redução de carga microbiana compatível com os níveis exigidos pela RDC No. 306; fornece biossegurança na sua manipulação e que resulta em plástico reciclável.

Palavras-chave: Hipoclorito de sódio e ácido acético, Carga microbiana, Resíduos de microbiologia, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Development and evaluation of a biosafe automatized system for treatment, recycling and discarding of clinical microbiology residues.

In Brazil, daily, 2.3 tons of potentially contaminated cultured medium with microorganisms are discarded. The RDC 306 resolution from the Brazilian National Health Department rules out that residue must be treated prior to discard in order to reduce microbial load. Two methods were developed to evaluate the sensitivity, efficiency and ideal concentration of a chemical agent (biocide) against microorganisms. The Ágar's Diffusion Method by Circular Perforator (PCA) and by Linear Perforator (PLA) were tested with 13 microorganism lines and the biocide composed by Sodium Hypochlorite (NaClO) and its combination with Acetic Acid (CH₃COOH). The microbial load reduction was evaluated by the real time reverse transcription-polymerase chain reaction. From the in vitro data, an automatic equipment to process the potentially contaminated culture media (SADEMC) was developed. The PCA method was reproductive and efficient to measure the bacterial growth inhibition induced by the biocide. The minimum biocide concentration capable to reduce the microbial growth was a solution of 0.25% NaClO (250 ppm) and 0.2% CH₃COOH (200 ppm). In the SADEMC, the direct exposition of 4.6 kg of culture media in 100 liters of biocide for a period of 15 minutes is capable to reduce the microbial load in approximately 1,4E10 of colony-forming unit. We may conclude that the SADEMC is able to promote a microbial load reduction more intense than the one demanded by the RDC 306 resolution. In addition to that, the SADEMC contemplates personnel safety and allows recycling the plastic residues

Keywords: Sodium hypochlorite and acetic acid, Microbial load, Laboratory microbiological waste, Real-time PCR.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Revolução Industrial e o Meio Ambiente	01
1.2 Resíduos sólidos no Brasil	02
1.3 Resíduos de serviços de saúde	04
1.4 A resolução da ANVISA RDC nº 306/2004	10
1.5 Resíduos de microbiologia	11
1.6 Biossegurança em serviços de saúde	13
1.7 Biossegurança em laboratório de microbiologia	15
1.8 Tecnologia alternativa de desinfecção	17
1.9 Biocida – critérios de escolha do desinfetante ideal	18
1.10 Hipoclorito de sódio – história	20
1.10.1 Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio	21
1.10.2 Compostos clorados – controvérsias	22
1.10.3 Métodos para avaliar a atividade dos desinfetantes	24
1.10.4 Atividade antimicrobiana do cloro e compostos	25
1.10.5 Hipoclorito de sódio – usos	26
1.10.6 Ácido acético (vinagre)	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Materiais utilizados na sensibilidade dos microorganismos ao hipoclorito de sódio pelo método de difusão com Perfurador Circular de Ágar (PCA)	32
4.2 Confecção do Perfurador Circular de Ágar	32
4.3 Método de difusão para estudo e sensibilidade utilizando perfuração circular de Ágar	34

	Pág.
4.3.1 Materiais utilizados na avaliação da sensibilidade dos microorganismos à combinação de hipoclorito de sódio e ácido acético usando o método de difusão com PCA	36
4.3.2 Procedimento do método de sensibilidade por difusão para microorganismos ao hipoclorito de sódio e ácido acético	37
4.4 Método de difusão para estudo sensibilidade dos microorganismos ao hipoclorito de sódio pelo método de difusão com Perfurador Linear de Ágar (PLA)	39
4.4.1 Confeção do Perfurador Linear de Ágar (PLA)	39
4.4.2 Procedimento do teste de sensibilidade dos microorganismos ao hipoclorito de sódio pelo método de difusão com PLA	41
4.5 Dosagem do hipoclorito de sódio: reagentes utilizados	44
4.6 Metodologia estatística	45
4.7 Avaliação da atividade bactericida do hipoclorito de sódio na fragmentação de DNA pela eletroforese.....	45
4.7.1 Precipitação de DNA bacteriano	46
4.7.2 Verificação de presença de material genético	46
4.7.3 Amplificação de fragmento de DNA bacteriano	47
4.7.4 Contagem bacteriana pela técnica de PCR em tempo real.....	47
4.7.5 Precipitação de RNA bacteriano	48
4.8 Descarte dos meios de cultura contaminados no desenvolvimento do equipamento (máquina)	50
4.8.1 Materiais usados	50
4.8.2 Componentes básicos e funções da máquina	51
4.8.2.1 Introdução	51
4.8.2.2 Componentes básicos e detalhamento da máquina	56
4.8.3 Motores	59
4.8.4 Eletroválvula de entrada de água	60
4.8.5 Painel de controle da máquina	62
4.8.5.1 Componentes do painel de controle	62

4.8.5.2	Procedimento operacional do SADEMC	65
4.8.6	Avaliação microbiológica dos resíduos pós-tratamento com biocida e o SADEMC	66
4.8.6.1	Materiais usados	66
4.8.6.2	Ensaio microbiológico da atividade bactericida do biocida combinado (NaClO e CH ₃ COOH).....	67
4.8.6.3	Ensaio microbiológico da atividade bactericida do biocida (NaClO e CH ₃ COOH) após tratamento com o SADEMC	67
4.8.6.4	Ensaio por PCR em tempo real após tratamento com o SADEMC	68
4.8.6.5	Avaliação da eficiência do SADEMC para redução da carga bacteriana, através da técnica de PCR em tempo real.....	70
5.	RESULTADOS	71
5.1	Comparação entre os resultados obtidos pelo método PLA	71
5.2	Comparação entre os resultados obtidos pelo método PCA	73
5.3	Análise dos resultados obtidos pelo método PCA com o uso do biocida hipoclorito de sódio combinado com ácido acético.....	75
5.4	Análise para determinar a concentração ideal do biocida pelo método PLA	77
5.5	Análise para determinar a concentração ideal do biocida pelo método PCA	80
5.6	Análise para determinar pelo método PCA a concentração ideal do biocida hipoclorito de sódio combinado com ácido acético.....	83
5.7	Comparação entre os métodos de inibição do crescimento bacteriano (PLA, PCA com NaClO e PCA com biocida combinado)	86
5.8	Atividade bactericida do hipoclorito de sódio com fragmentação de DNA avaliado pela PCR e PCR em tempo real	93
5.9	Quantificação de rRNA bacteriano	94
5.9.1	Ensaio microbiológico da atividade bactericida do biocida combinado (NaClO e CH ₃ COOH).....	101
5.9.2	Ensaio microbiológico do efeito da atividade bactericida do biocida combinado (NaClO e CH ₃ COOH) no SADEMC	102

5.9.3	Sistema Automático de Tratamento e Descarte de Meios de Cultura Contaminados (SADEMC)	103
5.9.4	Diferenças e custo/benefício do sistema automatizado em comparação com autoclave	107
5.9.5	Avaliação da eficiência do SADEMC para redução da carga bacteriana, através da técnica de PCR em tempo real	109
6.	DISCUSSÃO	110
7.	CONCLUSÕES	119
8.	CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO	120
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Cepas de microorganismos liofilizados provenientes da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (IAL - São Paulo) e cepas de referência da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Rockville, MD, USA).....	34
Tabela 2. Resumo dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos para todas as concentrações de hipoclorito de sódio pelo método PLA	71
Tabela 3. Análise de variância (método PLA)	72
Tabela 4. Resumo dos diâmetros de inibição de crescimento bacteriano dos halos obtidos para todas as concentrações de hipoclorito de sódio pelo método PCA para todas as concentrações de hipoclorito de sódio	73
Tabela 5. Análise de variância (método PCA).....	74
Tabela 6. Agrupamento de microorganismos de acordo com seu comportamento diante do NaClO.....	75
Tabela 7. Resumo dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos pelo método PCA para todas as concentrações de ácido acético combinado com hipoclorito de sódio.....	76
Tabela 8. Análise de variância (hipoclorito de sódio e ácido acético pelo método PCA)	77
Tabela 9. Comparações entre as concentrações (PLA).....	78
Tabela 10. Comparações entre as concentrações hipoclorito de sódio pelo método PCA.....	81
Tabela 11. Comparações entre as concentrações pelo método PCA utilizando hipoclorito de sódio combinado com ácido acético	84
Tabela 12. Comparações entre as concentrações (3 métodos).....	87

Tabela 13. Agrupamento de microorganismos de acordo com seu comportamento diante do NaClO e NaClO e CH ₃ COOH	88
Tabela 14. Valores do ciclo de detecção de sinal de sonda Taqman® de acordo com a concentração de RNA das amostras pela escala de MacFarland.....	97
Tabela 15. Atividade bactericida da solução combinada de NaClO e CH ₃ COOH	102
Tabela 16. Resultados dos testes microbiológicos realizados em meios de hemocultura (Bactec plus) após contato das bactérias com o biocida (NaClO e CH ₃ COOH)	103
Tabela 17. Especificações, tempo, rotações, peso e volume do SADEMC.....	107
Tabela 18. Contagem bacteriana por PCR em tempo real, pré e pós SADEMC.....	109

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

	Pág.
Figura 1. Molde de aço para ferfurar o meio de cultura (Ágar de Müller Hinton ou Perfurador Circular de Ágar (PCA)	33
Figura 2. Padrão do halo inibição formado ao redor das cavidades contendo soluções de NaClO de 0,031% a 4,0% após 24 horas da semeadura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, usando o método de difusão em poços circulares (PCA)	36
Figura 3. Padrão do halo de inibição de crescimento bacteriano formado ao redor das cavidades contendo soluções de NaClO em concentrações de, 0,125 a 1,0% (poços A, B, C e D) e NaClO acidificado com CH ₃ COOH de 0,1 a 0,8% (poços 1, 2, 3 e 4) após 24 horas da semeadura de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, usando o método de difusão em poços circulares (PCA)	38
Figura 4. Perfurador Plano de Ágar (PLA).....	40
Figura 5. Perfuração do ágar	40
Figura 6. Retirada do ágar com agulha	40
Figura 7. Extração por pipetagem por porcentagem da solução de NaClO	42
Figura 8. Adição de NaClO às cavidades	42
Figura 9. Padrão do halo de inibição formado ao redor das cavidades contendo soluções de NaClO de 0,031% a 4,0% após 24 horas da semeadura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 pelo PLA	43
Figura 10. ETEST – fita de papel impregnada com suspensão decrescente de antimicrobiano; halo em forma de raquete.....	43
Figura 11. Apresentação esquemática do projeto original para a construção da máquina	52

	Pág.
Figura 12. Tambor de metal com cesto cilíndrico operado manual e mecanicamente	52
Figura 13. Tanque de lavar roupa com cesto de metal.....	53
Figura 14. Tanque de lavar roupa com manivela.....	53
Figura 15. Esquema expandido do projeto do sistema automatizado de tratamento e descarte de meios de cultura contaminados.....	56
Figura 16. Esquema do procedimento operacional da máquina	61
Figura 17. Painel de controle da máquina.....	64
Figura 18. Fotografia do sistema automatizado de tratamento e descarte de meios de cultura contaminados	65
Figura 19. Carga de placas com meios de cultura contaminados a serem processados no SADEMC	69
Figura 20. Frasco de cultura aeróbico C/F (Becton Dickinson, USA)	69
Figura 21. Instrumento de monitoramento contínuo de cultura de sangue modelo 9050 (Becton Dickison, USA)	70
Figura 22. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH ₃ COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	89
Figura 23. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH ₃ COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (<i>Candida albicans</i>).....	89
Figura 24. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH ₃ COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (<i>Escherichia coli</i>)	90

- Figura 25.** Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Bacillus subtilis*) 91
- Figura 26.** Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Enterococcus faecalis*) .. 91
- Figura 27.** Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Pseudomonas aeruginosa*)..... 92
- Figura 28.** Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Shigella flexneri*)..... 92
- Figura 29.** Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (mistura das 13 cepas) .. 93
- Figura 30.** Fotografia do gel de Ágarose a 5% e brometo de etídio sob emissão de luz UV. (1) Amostra controle contendo solução bacteriana pura. (2) Amostra com solução bacteriana + 0,5% de NaClO a 1%. (3) Amostra com solução bacteriana pura + igual volume de solução fisiológica. 94

- Figura 31.** Determinação de intensidade de fluorescência emitida pelas reações de SYBR-Green. As amostras submetidas à solução salina (linhas vermelha e púrpura) apresentam um sinal de detecção a partir dos ciclos 17 e 20. As amostras submetidas ao mesmo volume de solução de NaClO a 1% (linha verde-escuro) e as amostras controle negativo (linhas marrom e verde-claro) apresentam sinal de detecção a partir do ciclo de número 30..... 95
- Figura 32.** Curva de dissociação dos produtos das reações de SYBR-Green. As amostras submetidas à solução salina (linhas vermelha e azul clara) apresentam um sinal único de dissociação. As reações que contêm as amostras submetidas às soluções de NaClO 1% (linha vermelha – inferior e verde-escuro), NaClO 0,03% (linhas púrpura e verde-claro) e a amostra controle negativo (linha marrom) apresentam sinais inespecíficos de dissociação 96
- Figura 33.** Curva de amplificação das soluções com concentrações de RNA por Taqman® em amostras bacterianas não diluídas equivalentes aos níveis 0,5 a 3 da escala de MacFarland..... 97
- Figura 34.** Curva de amplificação das soluções com concentrações de RNA por Taqman® do tubo 4 a 10 da escala MacFarland em amostras bacterianas não diluídas..... 98
- Figura 35.** Curva de amplificação de RNA por Taqman® das soluções com concentrações de diluições 1:10 a partir tubo 0,5 da escala Macfarland até a concentração final de 15 (A) ou até 150 (B) ufc/mL utilizadas como curva padrão para cálculo de diminuição de carga bacteriana..... 98
- Figura 36.** Curva de amplificação de RNA por Taqman® dos meios de cultura contaminados submetidos ao tratamento com solução biocida (NaClO + CH₃COOH) nos tempos 30 segundos, 5, 15, 30 e 60 minutos. 100

Figura 37. Curva de amplificação de RNA por Taqman® dos meios de cultura contaminados submetidos ao tratamento com solução biocida (NaClO + CH ₃ COOH) nos tempos 30 segundos, 5, 15, 30 e 60 minutos após incubação em meio de cultura por 24 horas.....	100
Figura 38. Curva de desempenho na limpeza das placas de Petri no SADEMC	106
Quadro 1. Comparativo econômico entre o SADEMC e AUTOCLAVE no Laboratório Álvaro	108
Quadro 2. Vantagens e desvantagens do SADEMC e AUTOCLAVE	117

Abreviaturas e Siglas

μL	Microlitro
[]	Concentração das soluções de acordo com a escala de MacFarland
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFNOR	<i>Association Française de Normalisation</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BaCl₂	Cloreto de bário
bactérias/mL	Bactérias por mL
BaSO₄	Sulfato de bário
BD	Becton Dickinson
C/F	Frasco de cultura aeróbico
células/mL	Células por mL
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i>
CH₃COOH	Ácido acético
CIM	Concentração inibitória mínima
CLP	Controlador lógico programável
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Ct	Ciclo do PCR em Tempo Real no qual a amostra cruza a linha de detecção
Cv	Coefficiente de variação
D	Densidade
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dnase	Desoxirribonuclease
DP	Desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Environmental Protection Agency

EPI	Equipamento de Proteção Individual
ETEST	Gradiente de concentração de antibióticos em tiras
GL	Graus de liberdade
g	Força gravitacional
H₂O	Água
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HBV	Vírus da Hepatite B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HCIO	Ácido hipocloroso
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KI	Iodeto de potássio
mA	Miliamperes
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
mol/L	Molaridade por litro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na₂S₂O₃	Tiosulfato de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
O₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
PCA	Perfurador Circular de Ágar
PGRSS	Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde
pH	Potencial hidrogênico
PLA	Perfurador Linear de Ágar
ppm	Partes por milhão
PVC	Policloreto de vinila
QM	Quadrado médio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

rDNA	DNA ribossômico
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotação por minuto
RSS	Resíduos de serviços de saúde
SADEMC	Sistema Automatizado de Descarte de Meios de Cultura Contaminados
Slope	Grau de inclinação da curva
SQ	Soma de quadrados
STA²T²	<i>State and Territorial Association on Alternate Treatment Technologies</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCDD	<i>Tetracloridibenzeno-p-dioxin</i>
THM	Trihalometanos
UDM	<i>Use-dilution method</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UV	Ultravioleta
VAM	Volume da amostra
VCC	Tensão em corrente contínua
VG	Volume gasto em mL

1. INTRODUÇÃO

1.1 Revolução Industrial e o Meio Ambiente

Durante a segunda metade do século XVIII, na Inglaterra, uma série de transformações no processo de produção de mercadorias deu origem ao que se convencionou chamar de 1ª Revolução Industrial (DERRY, 1986). A velocidade do desenvolvimento industrial, tecnológico e científico, em cerca de 250 anos, não permitiu prever que além do êxodo rural e da diminuição de empregos em função da automação, seriam gerados problemas para o meio ambiente (DEANE, 1979). Graus acentuados de interferência nos processos naturais e efeitos indesejáveis para o ambiente começaram a ser notados. Os problemas de degradação ambiental mais ou menos graves, e que ocorrem em escala local ou global – todos eles com conseqüências negativas para a sobrevivência das formas de vida adaptadas ao ambiente da superfície da Terra são hoje bem caracterizados. A poluição do ar, água, solos, a contaminação de alimentos e o volume de resíduos sólidos são as maiores heranças desse crescente desenvolvimento e têm grande impacto sobre a saúde da população e o meio ambiente (MATHIAS; DAVIS, 1990; BERLANSTEIN, 1992; FARR, 2003; DEANE, 1979). As discussões sobre os problemas ambientais que afetam o planeta e colocam em risco a vida na Terra têm sido cada vez mais freqüentes. Estas acontecem tanto em nível informal como em simpósios científicos e envolvem desde pequenos grupos sociais até as nações. Em dois momentos houve reuniões patrocinadas pela Organização das Nações Unidas para debater questões globais com vistas à busca de soluções para os problemas de ordem ambiental que afligem o planeta: a primeira em Estocolmo em 1972 e a segunda no Rio de Janeiro em 1992. Essas conferências chamaram a atenção das nações para o fato de que a ação humana estava causando séria degradação da natureza e criando graves riscos para o bem-estar e para a própria sobrevivência da humanidade. Esta ação tem sido marcada por uma visão antropocêntrica de mundo, em que o ser humano é tido como o centro e o alvo de toda a atividade realizada no planeta, desconsiderando o fato de que a espécie humana é parte da grande cadeia ecológica que rege a vida. A Conferência de Estocolmo foi um importante marco

ambiental, pois chamou a atenção do mundo para a gravidade da situação nesse setor (SANDERS, 1973). A delegação brasileira, a princípio cética, assinou depois sem reserva a “Declaração de Estocolmo”. Em consequência, Henrique Brandão Cavalcanti, Secretário Geral do Ministério do Interior e membro da delegação brasileira, ao retornar ao Brasil, promoveu a elaboração do decreto que instituiu, em 1973, a Secretaria Especial do Meio Ambiente. Esta iniciou suas atividades em 14 de janeiro de 1974. Em 1988, a Assembléia Geral das Nações Unidas aprovou uma resolução determinando a realização, até 1992, de uma conferência sobre o meio ambiente e o desenvolvimento que pudesse avaliar como os países haviam promovido a proteção ambiental desde a Conferência de Estocolmo de 1972 (NETO, 2005). Na sessão que aprovou essa resolução, o Brasil ofereceu-se para sediar o encontro em 1992. Como resultados dessa última conferência, foram assinados cinco documentos. São eles: a Declaração do Rio sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, a Agenda 21, o documento Princípios para a Administração Sustentável das Florestas, a Convenção da Biodiversidade e a Convenção sobre Mudança do Clima (NOVAES, 2005).

1.2 Resíduos sólidos no Brasil

Resíduos nos estados sólido e semi-sólido são os que resultam de atividades da comunidade e podem ser de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços de varrição, etc. Ficam incluídos nesta definição o lodo proveniente de sistemas de tratamento de água, aquele gerado em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (ABNT, 1987).

A questão dos resíduos sólidos no Brasil tem sido amplamente discutida na sociedade a partir de vários levantamentos da situação atual no país e das perspectivas do setor. De forma geral, este assunto se liga a várias áreas do conhecimento, como saneamento básico, estudo do meio ambiente, inserção social e econômica dos processos de triagem e reciclagem dos materiais e,

mais recentemente, ainda de forma incipiente, o aproveitamento energético dos gases provenientes dos aterros sanitários (GUNTER, 2000). De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, realizada pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, são coletadas diariamente 228.413 toneladas de resíduos no Brasil (IBGE, 2002).

O serviço sistemático de limpeza urbana no país foi iniciado oficialmente em 1866, na cidade de São Sebastião do Rio de Janeiro, então capital do Império. O empresário Aleixo Gary, francês de origem, assinou contrato em 11 de outubro de 1876 com o Ministério Imperial para organizar o serviço de limpeza da cidade do Rio de Janeiro. O serviço incluía remoção de lixo das casas e praias e posterior transporte para a Ilha de Sapucaia, onde hoje fica o bairro do Caju. Ele permaneceu no cargo até o vencimento do contrato, em 1891. Em seu lugar, entrou o primo, Luciano Gary, de cujo sobrenome origina-se a palavra gari, que hoje denomina os trabalhadores da limpeza urbana em muitas cidades brasileiras. A empresa foi extinta um ano depois, sendo criada a Superintendência de Limpeza Pública e Particular da Cidade, cujos serviços deixavam a desejar (MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2005; COMLURB, 2005). Dos tempos imperiais aos dias atuais, os serviços de limpeza urbana vivenciaram momentos bons e ruins. Hoje, a situação da gestão dos resíduos sólidos se apresenta de forma diversa em cada cidade brasileira.

A interdependência dos conceitos de meio ambiente, saúde e saneamento é evidente, o que reforça a necessidade de integração das ações desses setores em prol da melhoria da qualidade de vida da população brasileira. Como um retrato desse universo de ações, há de se considerar que mais de 70% dos municípios brasileiros possuem menos de 20.000 habitantes e que a concentração urbana da população no país ultrapassa a casa dos 80% (IBGE, 2000). Isso reforça as preocupações com os problemas ambientais urbanos e, entre estes, o do gerenciamento dos resíduos sólidos, que é atribuição da administração pública local. As instituições responsáveis pelos resíduos sólidos municipais e pelos resíduos perigosos, no âmbito nacional, estadual e municipal, são determinadas pela Constituição Federal, a saber: incisos VI e IX, do art. 23, que estabelecem ser competência comum da União, dos estados, do Distrito Federal e dos municípios proteger o meio ambiente e

combater a poluição em quaisquer das suas formas, bem como promover programas de construção de moradias e a melhoria do saneamento básico. Já os incisos I e V, do art. 30, estabelecem como atribuição municipal legislar sobre assuntos de interesse local, especialmente quanto à organização dos seus serviços públicos, como é o caso da limpeza urbana (CONSTITUIÇÃO FEDERAL, 1988).

Tradicionalmente, no Brasil, é da competência do Município a gestão dos resíduos sólidos produzidos em seu território, com exceção dos de natureza industrial, mas incluindo os provenientes dos serviços de saúde. No que se refere à competência para o licenciamento de atividades poluidoras e ao controle ambiental, o inciso I do art. 30 já mencionado estabelece a principal competência legislativa municipal, qual seja: "legislar sobre assuntos de interesse local", estabelecendo, assim, o caminho para dirimir aparentes conflitos entre a legislação municipal, a federal e a estadual. O Município tem competência para regulamentar o uso do solo em seu território. Assim, é ele quem emite as licenças para qualquer construção e o alvará de localização para o funcionamento de qualquer atividade, sendo esses instrumentos indispensáveis para a localização, a construção, a instalação, a ampliação e a operação de qualquer empreendimento em seu território. Portanto, o Município pode perfeitamente estabelecer parâmetros ambientais para a concessão ou não destas licenças e alvarás. A lei federal que criou o licenciamento ambiental, quando menciona que ela é exigível "sem prejuízo de outras licenças exigíveis", já prevê a possibilidade de que os municípios façam esta exigência (MONTEIRO, 2001).

1.3 Resíduos de serviços de saúde

No Brasil, das 228.413 toneladas de resíduos coletadas diariamente, estima-se que de 1 a 2% correspondam aos RSS, totalizando aproximadamente 2.300 toneladas diárias. Ainda segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 74% dos municípios brasileiros depositam o "lixo hospitalar" a céu aberto, 57% separam os dejetos nos hospitais e apenas

14% das prefeituras o tratam adequadamente. Os RSS são aqueles gerados em qualquer serviço prestador de assistência médica, sanitária ou estabelecimentos congêneres, podendo ser provenientes de farmácias, hospitais, unidades ambulatoriais de saúde, clínicas e consultórios médicos e odontológicos, laboratórios de análises clínicas e patológicas, instituições de ensino e pesquisa médica, bancos de sangue e clínicas veterinárias. A classificação dos RSS objetiva destacar a composição desses resíduos segundo as suas características biológicas, físicas, químicas, estado da matéria, e origem, para seu manejo seguro. A classificação adotada é baseada na RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) em Resolução CONAMA nº. 358, de 29 de abril de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Os resíduos foram classificados em quatro grupos (A, B, C, D e), e no itens e subitens de cada grupo, assim distribuídos:

I - GRUPO A: Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção.

a) A1

1. culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; descarte de vacinas de microrganismos vivos ou atenuados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética;
2. resíduos resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação biológica por agentes classe de risco 4; microrganismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causadores de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido;

-
3. bolsas transfusionais contendo sangue ou hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação, ou com prazo de validade vencido e aquelas oriundas de coleta incompleta;
 4. sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos; recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, contendo sangue ou líquidos corpóreos na forma livre;

b) A2

1. carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microorganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microorganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram ou não submetidos a estudo anátomo-patológico ou confirmação diagnóstica;

c) A3

1. peças anatômicas (membros) do ser humano; produtos de fecundação sem sinais vitais, com peso menor que 500 gramas ou estatura menor que 25 centímetros ou idade gestacional menor que 20 semanas, que não tenham valor científico ou legal e não tenham sido requisitados pelo paciente ou familiares;

d) A4

1. “kits” de linhas arteriais, endovenosas e dialisadores, quando descartados;
2. filtros de ar, e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, entre outros similares;
3. sobras de amostras de laboratório e seus recipientes contendo fezes, urina e secreções, provenientes de pacientes que não contenham e nem sejam suspeitos de conter agentes classe de risco 4, e nem apresentem relevância epidemiológica e risco de disseminação ou microrganismo causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido ou com suspeita de contaminação;
4. resíduos de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, lipoescultura ou outro procedimento de cirurgia plástica que gere este tipo de resíduo;
5. Recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, que não contenham sangue ou líquidos corpóreos na forma livre;
6. peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de estudos anátomo-patológicos ou de confirmação diagnóstica;
7. carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microorganismos, bem como suas forrações;
8. bolsas transfusionais vazias ou com volume residual pós-transfusão.

e) A5

1. Órgãos, tecidos, fluídos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais com suspeita ou certeza de contaminação.

II - GRUPO B: Resíduos contendo substâncias químicas que podem representar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade.

- a) produtos hormonais e produtos antimicrobianos; citostáticos; antineoplásicos; imunossupressores; digitálicos; imunomoduladores; anti-retrovirais, quando descartados por serviços de saúde, farmácias, drogarias e distribuidores de medicamentos, ou apreendidos; resíduos e insumos farmacêuticos dos medicamentos controlados pela Portaria MS 344/98 e suas atualizações;
- b) resíduos de saneantes, desinfetantes, desinfestantes; resíduos contendo metais pesados; reagentes para laboratório, inclusive os recipientes contaminados por estes;
- c) efluentes de processadores de imagem (reveladores e fixadores);
- d) efluentes dos equipamentos automatizados utilizados em análises clínicas; e
- e) demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da NBR 10.004 da ABNT (tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos).

III - GRUPO C: Quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de eliminação especificados nas normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e para os quais a reutilização é imprópria ou não prevista.

- a) enquadram-se neste grupo quaisquer materiais resultantes de laboratórios de pesquisa e ensino na área de saúde, laboratórios de análises clínicas e serviços de medicina nuclear e radioterapia que contenham radionuclídeos em quantidade superior aos limites de eliminação.

IV - GRUPO D: Resíduos que não apresentem risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares.

- a) papel de uso sanitário e fralda, absorventes higiênicos, peças descartáveis de vestuário, resto alimentar de paciente, material utilizado em antissepsia e hemostasia de venóclises, equipo de soro e outros similares não classificados como A1;
- b) sobras de alimentos e do preparo de alimentos;
- c) restos alimentares de refeitórios;
- d) resíduos provenientes das áreas administrativas;
- e) resíduos de varrição, flores, podas e jardins; e
- f) resíduos de gesso provenientes de assistência à saúde.

V - GRUPO E: Materiais perfurocortantes ou escarificantes, tais como: lâminas de barbear, agulhas, ampolas de vidro, brocas, limas endodônticas, pontas diamantadas, lâminas de bisturi, lancetas; tubos capilares; micropipetas; lâminas e lamínulas; espátulas; e todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório (pipetas, tubos de coleta sanguínea e placas de Petri) e outros similares.

1.4 A resolução da ANVISA RDC nº. 306/2004

No mês de dezembro de 2004 um importante documento foi aprovado. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, considerando a necessidade de aprimoramento, atualização e complementação dos procedimentos relativos ao gerenciamento dos (RSS) com vistas a preservar a saúde pública e a qualidade do meio ambiente, considerando os princípios da biossegurança de empregar medidas técnicas, administrativas e normativas para prevenir acidentes, preservando a saúde pública e o meio ambiente; considerando que os serviços de saúde são os responsáveis pelo correto gerenciamento de todos os RSS por eles gerados, atendendo às normas e exigências legais, desde o momento de sua geração até a sua destinação final; considerando que a segregação dos RSS, no momento e local de sua geração, permite reduzir o volume de resíduos perigosos e a incidência de acidentes ocupacionais dentre outros benefícios à saúde pública e ao meio ambiente; considerando a necessidade de disponibilizar informações técnicas aos estabelecimentos de saúde, assim como aos órgãos de vigilância sanitária, sobre as técnicas adequadas de manejo dos RSS, seu gerenciamento e fiscalização; adotou a Resolução da Diretoria Colegiada, aprovando o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde que determina como competência da Vigilância Sanitária dos estados, dos municípios e do Distrito Federal, com o apoio dos Órgãos de Meio Ambiente, de Limpeza Urbana, e da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), divulgar, orientar e fiscalizar o cumprimento da Resolução. A vigilância sanitária dos estados, dos municípios e do Distrito Federal, visando o cumprimento do Regulamento Técnico, poderá estabelecer normas de caráter supletivo ou complementar, a fim de adequá-lo às especificidades locais. A abrangência do regulamento aplica-se a todos os geradores de RSS. A norma estabelece que todo o gerador deve elaborar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) baseado nas características dos resíduos gerados. O gerenciamento dos RSS constitui-se em um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas e técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a

produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores e à preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente. O gerenciamento deve abranger todas as etapas de planejamento dos recursos físicos, dos recursos materiais e da capacitação dos recursos humanos envolvidos no manejo dos RSS (ANVISA, 2004). Os resíduos que fazem parte do estudo proposto são classificados como sendo do GRUPO A1. 1.

1.5 Resíduos de microbiologia

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2000), os resíduos de microbiologia são culturas e estoques de microorganismos, meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas. No capítulo VI (Manejo de RSS), item 5.1 do grupo A1, da Resolução RDC nº 306/2004 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), estes resíduos não podem deixar a unidade geradora sem tratamento prévio. O item 5.1.2 deixa claro que os resíduos devem ser submetidos a tratamento utilizando processos físicos ou de outra natureza que vierem a ser validados para obtenção da redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de Inativação Microbiana.

Os resíduos potenciais de contaminação e o descarte final de reagentes, materiais biológicos e principalmente meios de cultura contaminados com microorganismos continuam sendo uma constante preocupação para profissionais de laboratórios de análises clínicas. A geração destes resíduos, em função da presença de materiais biológicos capazes de causar infecção, requer cuidados específicos de acondicionamento, transporte, coleta, tratamento e descarte final. Tendo em vista a sua própria natureza, os resíduos sólidos ou semi-sólidos, no caso específico citado, enquanto matéria, resultam sempre em um rejeito para descarte final no solo e, portanto, seja qual for o processo de tratamento adotado, devem ser dispostos em aterro sanitário ou esgoto. Este aterro deve ser adequadamente projetado, operado e monitorado

tanto para descarte das cinzas ou escórias provenientes de incineração como para carga esterilizada em autoclaves ou para os rejeitos tratados por outra tecnologia.

Os processos de tratamentos especiais, além de onerosos, costumam causar algum tipo de impacto ambiental indesejável.

Os resíduos sólidos, semi-sólidos e líquidos provenientes do setor de microbiologia dos laboratórios de análises clínicas (meios de cultura contaminados juntamente com placas ou outros descartáveis de plástico) são rotineiramente acondicionados em sacos plásticos, autoclavados e enviados para o descarte (por intermédio de serviços públicos ou privados) em aterro sanitário. Este processo envolve aspectos de saúde quanto à segurança dos técnicos que manipulam estes resíduos, desperdício de recursos financeiros em custos de energia elétrica, e impacto ambiental após o destino final do rejeito.

Segundo informações de empresas fornecedoras de produtos para laboratórios (comunicação pessoal), durante o ano de 2004 foram consumidas 30 toneladas de meios de cultura liofilizados fornecidos a laboratórios de análises clínicas e à indústria de alimentos. Esta quantidade de meios desidratados, em média, depois de hidratados, representa cerca de 855 toneladas de meios de cultura prontos para uso. Sendo gerados e descartados após o uso o total de 2,3 toneladas/dia de meios potencialmente contaminados, representam de 0,092% a 0,18% do total de RSS produzidos diariamente no Brasil. Baseando-se em amostragem de alguns centros hospitalares (Curitiba - PR, Florianópolis - SC, Porto Alegre - RS, 2004) e de laboratórios de microbiologia públicos e privados (comunicação pessoal) e no número de laboratórios no Brasil, pode-se inferir que o volume atual de resíduos de microbiologia produzidos por ano é da ordem de 650 toneladas. A diferença entre as duas análises (fornecedores e informações de laboratórios de análises clínicas) é insignificante.

1.6 Biossegurança em serviços de saúde

Biossegurança é, no seu conceito amplo, o conjunto de saberes direcionado para ações de prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, atividades essas que possam comprometer a saúde do ser humano, dos animais, das plantas e do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (CTBio-FIOCRUZ, 2005). O fundamento básico da biossegurança é assegurar o avanço dos processos tecnológicos, protegendo a saúde humana, animal e o meio ambiente (HIRATA; MANCINI-FILHO, 2002). Portanto, a questão dos RSS não pode ser analisada apenas no aspecto da transmissão de doenças infecciosas; também está envolvida a questão da saúde do trabalhador e da preservação do meio ambiente, sendo essas questões também compreendidas no conceito de biossegurança.

Dentre o volume total de resíduos gerados nos hospitais norte-americanos, acredita-se que em torno de 10-15% sejam realmente perigosos e considerados infectantes (RUTALA; MAYHALL, 1992). Esses resíduos incluem os perfurocortantes e os recipientes contendo culturas de microrganismos vivos. O restante é resíduo do qual boa parte pode ser reciclada, desde que haja segregação adequada. Vários estudos demonstram que a maioria dos acidentes de trabalho com perfurocortantes ocorre no momento do descarte desses resíduos (RYDELL, 2004; RITZKOWSKY, 1994; WEISMANN, 1996; MELZER; VERMUND; SHELOV, 1989).

Shiao e colaboradores relataram que as agulhas foram os itens mais freqüentemente associados a lesões, ocorrendo habitualmente por ocasião de reencapamento ou coleta. (SHIAO *et al.*, 1999). Estes autores estudaram a ocorrência de acidentes com perfurocortantes no pessoal de apoio de um hospital tailandês, incluindo trabalhadores da lavanderia, da limpeza, da recepção e do almoxarifado, e constataram que 61% desses funcionários tinham sofrido uma lesão com perfurocortante no último ano, mas que apenas 25,4% a reportaram. A maioria dos acidentes ocorreu com funcionários da limpeza que manipulavam materiais perfurocortantes descartados

inadequadamente pela equipe clínica. O descarte inadequado estava associado a 54,7% do total das lesões. Os acidentes de trabalho com material biológico representam risco para os trabalhadores das instituições hospitalares e dos laboratórios de análises clínicas devido à possibilidade de transmissão de patógenos como o HBV e o HIV. Os acidentes ocasionados por material perfurocortantes são responsáveis por 80 a 90% das transmissões de doenças infecciosas entre os trabalhadores dos serviços de saúde (GODFREY, 2001).

No Brasil, a inexistência de um sistema de vigilância de acidentes de trabalho com material biológico faz com que haja poucos estudos epidemiológicos sobre lesões ocupacionais envolvendo RSS. Os estudos existentes no país referem-se a programas específicos realizados em hospitais universitários e outros serviços de saúde, de forma individualizada (RAPPARINI, 2005). Alguns trabalhos demonstram que a maioria dos acidentes envolve a equipe de enfermagem, os médicos, os estudantes de medicina e de enfermagem e os funcionários de laboratório e da limpeza (SMITH; LEGGAT, 2005; PIDO; KAGIMU, 2005; ELLIOTT; KEETON; HOLT, 2005; HOBAN, 2005; LEE *et al.*, 2005). A imensa maioria dos acidentes está relacionada com objetos perfurocortantes (CIORLIA; ZANETA, 2004; FEARNE *et al.*, 1997; RITZKOWSKY, 1994). Alguns autores relataram que, em seis anos, foram tratados aproximadamente 1.300 casos de acidentes envolvendo materiais biológicos no Hospital São Paulo (MARINO *et al.*, 2001). Desses acidentes, 90% foram ferimentos percutâneos, a maioria envolvendo agulhas. Robazzi estudou o trabalho desenvolvido pelos funcionários coletores de lixo da cidade de Ribeirão Preto - SP na década de 1980, quando levantou os acidentes de trabalho notificados. Durante três anos de investigação foram registrados 332 acidentes de trabalho em 159 garis. Em relação às causas provocadoras desses acidentes, predominou aquela relacionada a problemas decorrentes do acondicionamento do lixo. A autora concluiu que a população era desinformada quanto aos aspectos relacionados ao recolhimento dos resíduos, acondicionando-os erroneamente, e que os garis não tinham o hábito de utilizar os EPI, mesmo quando oferecidos pelas empresas (ROBAZZI, 1991).

Dados da Pesquisa Nacional do Saneamento (IBGE, 2002) revelam que dos 5.507 municípios brasileiros, apenas 451 possuem coleta seletiva e

somente 352 operam usinas de reciclagem. Materiais perfurocortantes – como seringas e lâminas de barbear – podem ser encontrados tanto nos resíduos de serviços de saúde quanto nos domiciliares. A diferença entre os resíduos citados é meramente de origem, não se podendo afirmar que um tipo de resíduo seja mais “contaminado” ou “infectante” que o outro. Ambos os tipos de resíduos apresentam microrganismos patogênicos viáveis. Tanto os RSS quanto os resíduos domiciliares comuns representam risco para quem os manipula ou entra em contato direto com eles (catadores, funcionários da limpeza do estabelecimento de saúde, funcionários dos serviços de recolhimento e descarte final dos resíduos), e para a comunidade, que é indiretamente exposta por meio dos aerossóis e vetores. Todos os profissionais da saúde têm obrigação ética com a promoção de saúde. Se um trabalhador que recolhe lixo sofre um acidente com uma seringa colocada juntamente com os resíduos domiciliares por uma pessoa leiga, temos um problema, mas se essa seringa for proveniente de um serviço de saúde, o caso é muito mais grave. É papel do gerador de RSS cumprir as normas de biossegurança para prevenir acidentes humanos e ambientais; é isso que a sociedade espera dele (REBELLO, 2003).

1.7 Biossegurança em laboratório de microbiologia

O ambiente de trabalho em um laboratório de microbiologia pode expor as pessoas a uma série de riscos, e várias infecções têm sido descritas na história da microbiologia (RICHMOND; MCKINNEY; 1999). Em 1941 foi publicada uma pesquisa de 74 casos de brucelose associados à contaminação em laboratórios nos Estados Unidos, que concluiu que a manipulação de culturas ou espécies ou ainda a inalação da poeira contendo a bactéria *Brucella* é eminentemente perigosa para os trabalhadores de laboratório. Muitos dos casos foram atribuídos à falta de cuidados ou à má técnica de manuseio de materiais infecciosos (MEYER; EDDIE, 1941). Em uma publicação sobre infecções ocorridas em laboratórios, foram relatadas 222 infecções virais, sendo 21 delas fatais. Em um terço dos casos fatais a provável

fonte era o manuseio de animais infectados. Vinte e sete (12%) dos casos relatados deveram-se a acidentes de mecanismo conhecido (SULKIN; PIKE, 1949). Em uma segunda publicação, baseada em um questionário enviado a 5.000 laboratórios, afirma-se que somente um terço dos 1.342 casos citados foram publicados. Neste trabalho, notou-se que a brucelose era a infecção mais freqüentemente encontrada nos relatórios e que esta, somada à tuberculose, à tularemia, ao tifo e à infecção estreptocócica, contribuía para 73% de todas as infecções bacterianas. O índice total de mortalidade era de 3% e somente 16% de todas as infecções relatadas estavam associadas a um acidente documentado; a maioria destes estava relacionada ao uso de pipetas, seringas e agulhas (SULKIN, 1951). Embora esses relatórios sugerissem que os funcionários de laboratórios estavam expostos a riscos elevados de contaminação pelos agentes que eles próprios manipulavam os índices atuais de infecção não estão disponíveis. Porém, há dados indicando que as equipes laboratoriais apresentam maiores índices de tuberculose, shigelose e de hepatite B do que a população em geral (HARRINGTON; SHANNON, 1976). Dados mais recentes de infecções causadas por RSS de laboratório de microbiologia foram documentados em 2000, quando três casos de tuberculose pulmonar foram diagnosticados em funcionários de uma unidade de tratamento de resíduos em Washington - EUA (JOHNSON *et al.*, 2000). A tipagem de DNA mostrava ser a cepa da bactéria idêntica à de amostra de *Mycobacterium tuberculosis* multidroga-resistente isolada de paciente que trabalhava na coleta de resíduos.

Embora não exista nenhum tipo de relatório nacional no Brasil que descreva as infecções associadas a laboratórios de microbiologia, os relatos históricos citados sugerem que uma rígida adesão às normas preventivas contribui para um meio de trabalho mais seguro e saudável para a equipe do laboratório, seus colaboradores e a comunidade ao redor. Para reduzir o potencial de risco de infecções associadas a laboratórios, as normas apresentadas pelo Ministério da Saúde (ANVISA, 2004) devem ser consideradas como uma orientação mínima. Elas devem ser adaptadas a cada laboratório e podem ser utilizadas juntamente com outras informações científicas disponíveis.

1.8 Tecnologia alternativa de desinfecção

O desenvolvimento de novos métodos ou de métodos modificados para o tratamento de RSS, utilizando calor, agentes químicos ou irradiação, tem fornecido soluções alternativas potenciais para o problema do descarte desses resíduos. No entanto, alguns desses métodos podem apresentar potenciais riscos ao meio ambiente e à saúde ocupacional. Não existe critério universalmente definido para avaliar a eficiência e a segurança dos processos de redução da carga microbiana em RSS. A uniformização das técnicas, estabelecida por consensos nacionais ou internacionais, pode fornecer potenciais benefícios adicionais após a aprovação dos processos.

Com a intenção de revisar e padronizar processos de tratamento dos RSS, alguns estados norte-americanos organizaram um comitê para o estudo das técnicas alternativas de redução da carga microbiana em RSS. Em fevereiro de 1993, em Atlanta, Geórgia – EUA, este comitê, o *State and Territorial Association on Alternate Treatment Technologies (STA²T²)*, reconheceu a necessidade de assumir o papel de coordenar e dar suporte a essas atividades. O termo “alternativo” foi definido como designando tecnologias diferentes das de esterilização ou incineração (TECHNICAL ASSISTANCE MANUAL, 1994). Para definir corretamente a inativação microbiana, requeria-se que a definição estabelecida incluísse dois aspectos: o qualitativo e o quantitativo. Com esta perspectiva, era necessário estabelecer qual a forma e o tipo do microorganismo afetado e quanto se requeria em termos de inativação (redução da carga microbiana). A conclusão do encontro de Atlanta resultou na elaboração de algumas recomendações estabelecendo “NÍVEIS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA”, que também foram adotadas por outros países. No Brasil, de acordo com a ANVISA e com a RDC n° 306/2004 (ANVISA, 2004), recomenda-se:

Nível I - Para inativação de bactérias vegetativas, fungos e vírus lipofílicos, redução igual ou maior que 6Log10;

-
- Nível II - Para inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, redução igual ou maior que 6Log10;
- Nível III - Para inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, redução igual ou maior que 6Log10, e para inativação de esporos do *Bacillus stearothermophilus* ou esporos do *Bacillus subtilis*, redução igual ou maior que 4Log10; e
- Nível IV - Para inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias e inativação de esporos do *Bacillus stearothermophilus*, redução igual ou maior que 4Log10.

1.9 Biocida - critérios de escolha do desinfetante ideal

Biocida é o termo empregado coletivamente para desinfetantes, esterilizantes químicos, antissépticos e preservativos (MURTOUGH *et al.*, 2001). Antissépticos são biocidas ou produtos que destroem ou inibem o crescimento bacteriano dentro ou fora do tecido (lavagens de mãos, etc.). Desinfetantes são similares, mas geralmente são produtos ou biocidas usados sobre objetos ou superfícies inanimadas. Desinfecção é um processo pelo qual microorganismos são removidos total ou parcialmente, ou inativados por processos químicos ou físicos (AUGUSTIN; LI-VEHMAS; ATROSHI, 2004; MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Esterilização refere-se a um processo físico ou químico que destrói ou remove todas as formas microbianas vivas, incluindo esporos. Antissépticos e desinfetantes são usados extensivamente em hospitais e outros serviços de saúde, em inúmeros tipos de superfícies. Em particular, essas substâncias fazem parte de diversas práticas de controle de infecções e podem ajudar na prevenção de infecções hospitalares (RUTALA, 1996). Uma grande variedade de agentes químicos ativos ou biocidas é usada com esta finalidade, sendo que alguns são usados há mais de uma centena de anos (BLOCH, 1991). Apesar disso, pouco se conhece sobre sua forma de ação. Em geral, os biocidas têm um espectro amplo de ação, maior que o dos antibióticos e, enquanto estes tendem a atuar em nível intracelular, os biocidas

podem ter múltiplos alvos. O amplo espectro do uso de antissépticos e desinfetantes tem propiciado algumas especulações quanto à resistência microbiana, em particular quanto à resistência cruzada aos antibióticos (RUSSELL; GOULD, 1988; HIGGINS *et al.*, 2001). É importante notar que muitos desses biocidas podem ser usados isoladamente ou em combinação com uma variedade de produtos considerados ativos contra microorganismos. A atividade antimicrobiana pode ser influenciada por vários fatores, como a presença de materiais orgânicos, sinergia, temperatura e diluição (LAMBERT *et al.*, 2003; RUSSELL, 2003).

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos, farmacêuticos e desinfetantes é bem conhecido; no entanto, o aumento de problemas associados ao uso destes agentes continua ocorrendo. O desinfetante ideal deve ter um amplo espectro de ação antimicrobiana, rápido efeito bactericida, deve ser solúvel em água, incolor, compatível com a superfície onde será utilizado, de fácil preparação, estável, atóxico, não inflamável, inodoro, de baixo custo, não deve oferecer risco ao operador (biossegurança) e não deve causar prejuízo ao meio ambiente (HIRATA; MANCINI, 2002a; RUTALA *et al.*, 1998)

A determinação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e antissépticos é um procedimento complexo e controverso. Publicações demonstram que há diferenças significativas entre os resultados publicados por diferentes laboratórios (AUGUSTIN; LI-VEHMAS; ATROSHI, 2004; MCDONNELL; RUSSELL, 1999; PAPAGEORGIU; MOCE-LLIVINA; JOFRE, 2001). As metodologias de avaliação microbiológica de desinfetantes químicos padronizadas para fins comerciais, para uso sobre superfícies em ambientes hospitalares, serviços de saúde em geral, em equipamentos ou para desinfetar materiais biológicos contaminados, com a finalidade de diminuir ou eliminar a concentração de microorganismos para posterior descarte, são questionáveis. Isto ocorre porque a eficácia necessária de um composto ativo, nas condições reais de uso, pela sua diversidade física (líquida, semi-sólida ou sólida), requer protocolos laboratoriais diferentes para cada caso.

1.10 Hipoclorito de sódio – história

Embora a aplicação científica dos desinfetantes e dos esterilizantes tenha se iniciado há cerca de 150 anos, o uso empírico dos desinfetantes é descrito há muito mais tempo (RUTALA; WEBER, 1997). Por volta de 800 a.C., o poeta grego Homero, na clássica aventura “A Odisséia”, relatou o uso do enxofre, na forma de dióxido, como um desinfetante. (MAZZOLA; VESSONI, 2000). A descoberta do cloro (em 1774) pelo químico sueco Scheele foi um grande evento da Química. Ao redor de 1785, Berthollet desenvolveu um líquido sanitizante baseado em hipoclorito de sódio (CAVANNA; ROCCHIETTA, 1961; SHAMPO; KYLE, 1975). O uso do hipoclorito de sódio como antisséptico teve início no final do século XVIII (1792); a empresa francesa Javel produziu uma solução contendo hipoclorito de sódio e potássio que se chamava *eau de Javel*. Em 1820, o químico francês La Barraque introduziu o hipoclorito de sódio a 2,5%, que ficou conhecido com o nome de licor de La Barraque, usado para desinfetar necrotérios, esgotos, estábulos, enfermarias de hospitais, navios e prisões. Este relatou também que os cirurgiões parisienses conseguiram sucesso no tratamento de casos de carbúnculo, gangrena, úlceras e de queimaduras quando as feridas foram cobertas com tecido contendo uma solução aquosa diluída de hipoclorito de sódio.

Oliver Wendell Holmes em Boston em 1843 (CAPLAN, 1994) e Ignaz Semmelweis em Viena em 1861 foram creditados com a descoberta da causa da febre puerperal e da sua prevenção (BRIDSON, 1996). Ambos concluíram independentemente que a doença era transferida de paciente para paciente pelos médicos e enfermeiras por meio de suas mãos e roupas. Enquanto Oliver Holmes observava que os pacientes de um médico que lavava as mãos com solução do hipoclorito de cálcio entre as visitas raramente ficavam doentes, Semmelweis por sua vez insistia para que os médicos, quando saíssem do quarto de autópsia, lavassem suas mãos com o cloreto do cálcio antes de examinar os pacientes obstétricos. Isto resultou em diminuição significativa na taxa de sépsis puerperal (BEST; NEUHAUSER, 2004; JAY, 1999; LANGE, 1997).

Embora os consensos de controle de infecção parecessem simples e altamente eficazes, desencadearam enorme oposição. Em 1915, no decorrer da Primeira Grande Guerra, o químico americano Henry Drysdale Dakin realizou um estudo com as soluções de hipoclorito de sódio e ressaltou seu valor antisséptico salientando, porém, a sua capacidade de irritar tecidos vivos em virtude da alta concentração de hidroxilas (HAWTHORNE-JR, 1983). Assim, propôs uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, com potencial hidrogênio-iônico próximo ao neutro, obtido a partir da adição do ácido bórico. Essa solução ficou conhecida como líquido de Dakin, em sua homenagem (PECORA *et al.*, 1987).

O tratamento de esgotos e a desinfecção do abastecimento de água, tornando-os livres de contaminação, representam marcos da saúde pública. A cloração foi usada primeiramente para o tratamento dos esgotos em Londres, em 1854. Em 1894, Traube estabeleceu as propriedades dos hipocloritos na purificação e desinfecção de água, porém o uso contínuo do cloro como um desinfetante da água foi adotado pela primeira vez na pequena cidade belga de Middekerke (em 1902). Johnson, em 1908, introduziu a cloração para a purificação da água na América do Norte. Com o passar dos anos, a cloração passou a ser usada extensivamente nos Estados Unidos.

A despeito da introdução de muitas classes de desinfetantes, os produtos que contêm hipoclorito continuam a desempenhar papel importante na melhoria da saúde pública, reduzindo a transmissão de agentes infecciosos que ocorre pela ingestão de água.

1.10.1 Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio

Os compostos liberadores de cloro são biocidas muito ativos para bactérias nas formas vegetativas Gram-positivas e Gram-negativas, para micobactérias, esporos bacterianos, fungos e vírus lipofílicos e hidrofílicos. O mecanismo exato pelo qual o cloro ativo destrói microorganismos ainda não foi demonstrado experimentalmente. Algumas teorias são sugeridas, tais como: combinação com proteínas da membrana celular formando compostos tóxicos

e inibição de reações enzimáticas essenciais, entre outras (DYCHDALA, 1991). Os desinfetantes à base de cloro reagem rapidamente com a matéria orgânica, incluindo sangue, fezes e tecidos. Seu grau de inativação é proporcional à quantidade de material presente. Portanto, a concentração de cloro disponível no processo de desinfecção deve ser alta o suficiente para satisfazer a demanda do cloro (cloro consumido pela carga orgânica presente) e fornecer cloro residual suficiente para destruir os microorganismos (BAGORDO *et al.*, 2003). Este fato deve ser cuidadosamente considerado quando se aplicam estes compostos para desinfecção e descontaminação de superfícies e objetos contendo sangue e outros fluidos corpóreos. O hipoclorito de sódio sofre decomposição fotoquímica, o que evidencia a necessidade do armazenamento em frascos opacos, ao abrigo da luz e, por ser corrosivo, em frascos que não sejam de metal. O efeito corrosivo e oxidante da solução aquosa de NaClO é, portanto um fator limitante para seu uso em equipamentos metálicos.

O efeito antimicrobiano e o exato mecanismo de ação do hipoclorito de sódio não estão elucidados. A inativação bacteriana é multifatorial: oxidação irreversível das enzimas e aminoácidos; perda do conteúdo intracelular; inibição da síntese protéica; oxidação de componentes respiratórios; decréscimo da produção de trifosfato de adenosina; quebra do DNA e depressão da síntese de DNA (DYCHDALA, 2001). A capacidade de redução da densidade óptica pela ação do hipoclorito de sódio sobre suspensões de células de microorganismos foi descrita em 1966 (RODE; WILLIAMS, 1966) em estudos do uso deste agente químico para examinar estruturas celulares de bactérias.

1.10.2 Compostos clorados – controvérsias

Neubert, ativista do *Greenpeace* diz que, desde sua criação, o cloro tem sido uma catástrofe química, referindo-se ao herbicida desfolhante chamado de agente laranja (usado pelos norte americanos no Vietnã entre 1962 e 1971 como parte de uma estratégia de destruir as plantações de arroz que alimentavam o inimigo e remover a folhagem da mata que servia de

abrigo). O agente laranja contém um dos mais fortes venenos existentes: uma variação da dioxina, chamada TCCD (2, 3, 7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina). Essa substância é produzida em muitos processos industriais que envolvem reações com cloro, tais como preparação de pesticidas, indústria polimérica, indústria têxtil, branqueamento de papéis, entre outros, sendo produzida também na incineração do lixo químico, hospitalar e do PVC. Os efeitos do agente laranja associado à dioxina tóxica incluiriam o câncer, diabetes e defeitos congênitos (MALKIN; FUMETO, 1999).

Por outro lado, a indústria química produz aproximadamente 15.000 diferentes compostos contendo o cloro como um dos componentes. A natureza produz aproximadamente 1.500 halogênios clorados (ABELSON, 1994). Quase 85% dos produtos farmacêuticos industrializados necessitam do cloro em algum estágio do processo. São exemplos o medicamento dimenidrinato (anti-emético), o cloridrato de pseudoefedrina (descongestionante), o cloridrato de procaína (anestésico local), a cloroquina (anti-malárico), a clortetraciclina (antibiótico) e outros (MALKIN; FUMETO, 1996). Desinfetantes químicos alternativos, como o ozônio e outros radicais livres de meia-vida curta têm sido usados no tratamento de água, mas nenhum deles tem demonstrado a segurança e eficácia do cloro (MINTZ, 1995).

O serviço público de tratamento de água na cidade de Lima (Peru) decidiu deixar de utilizar a cloração da água porque a Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) fez estudos nos meados de 1980 mostrando um hipotético aumento de risco de câncer associado ao consumo de trialometanos (THM) que incluem o clorofórmio, o bromodiclorometano, o clorodibromometano e o bromofórmio, subprodutos da cloração. Um desses estudos, baseado em altas doses usadas em experimentos com animais, estimou que os THM causariam 700 casos adicionais de câncer por ano, nos Estados Unidos. Por outro lado, só a epidemia da cólera na América Latina, em 1991, ceifou aproximadamente 4.000 vidas (SWERDLOW *et al.*, 1992). A idéia de que a cloração para desinfecção da água causa câncer tem ganhado espaço na imprensa leiga, entre a população e entre muitos ambientalistas em países em desenvolvimento; contudo, as evidências que suportam essa afirmação não são consistentes. Uma revisão publicada no *Journal of the National Cancer*

Institute encontrou somente evidências equívocas para aumento de casos de câncer em ratas que receberam água clorada sete dias por semana durante 2 anos em quantidades de 70 a 275 partes por milhão ou 50 a 200 partes por milhão; não foi evidenciada atividade carcinogênica em ratas ou camundongos machos e fêmeas expostos às mesmas doses (DUNNICK; MELNICK, 1993). É importante observar que o regulamento do EPA permite níveis residuais de cloro na água somente em concentrações que não excedam 1,5 a 4,0 partes por milhão (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1979). Assim como em relação à carcinogênese, não há dados disponíveis na literatura sobre a mutagenicidade do gás cloro, muito embora a mutagenicidade das soluções de cloro (hipoclorito e seus sais) tenha sido investigada. Foi demonstrado que o hipoclorito de sódio tem alguma atividade mutagênica *in vitro* sobre bactérias e células mamárias. Entretanto, não há evidência de atividade *in vivo* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

As evidências quanto a efeitos nocivos da adição de produtos clorados à água potável não são, enfim, consistentes. A Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer (IARC), após uma revisão exaustiva, concluiu que os estudos epidemiológicos que relacionam o câncer e o consumo de água clorada eram inadequados para se obter conclusões definitivas (MORRIS, 1992).

1.10.3 Métodos para avaliar a atividade dos desinfetantes

Os métodos reconhecidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América do Norte para avaliar a atividade de uma substância bactericida são aqueles preconizados pela Associação Internacional de Analistas Químicos (AOAC Internacional). Entre eles estão o método de diluição (*Use-dilution method* - UDM), o método para superfícies duras (superfícies friccionadas com *swab* úmido) e o método para produtos sob forma de *spray*. Os dois primeiros métodos são usados para produtos líquidos. Cada método serve para as 3 bactérias e é destinado a avaliar a atividade bactericida do desinfetante sobre *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e

Pseudomonas aeruginosa (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2002). Esses métodos são também usados para dar suporte à validação da eficácia de desinfetantes contra bactérias patogênicas não listadas na descrição dos métodos originais (RUTALA; WEBER, 2004). Países como Brasil, Alemanha e França seguem e aceitam os métodos recomendados pela AOAC para a avaliação de desinfetantes, biocidas e germicidas.

Nestes últimos 25 anos, os métodos da AOAC têm sido submetidos a extensivos exames e estudos colaborativos, os quais têm revelado níveis inaceitáveis de variabilidade inter-laboratorial. A maior causa destas variações é a ampla variabilidade do número de bactérias no teste de cilindros (método de diluição – anéis cilíndricos), na lavagem e na falta de uma técnica quantificação adequada, além das características dos patógenos. Por meio da ASTM, da AOAC e da AFNOR diversas ações e constantes esforços têm sido feitos para padronizar e melhorar os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana dos desinfetantes. Há também um movimento para harmonizar as metodologias dos testes para desinfetantes entre países que têm acordos comerciais.

1.10.4 Atividade antimicrobiana do cloro e compostos

Baixas concentrações de cloro livre (24 ppm ou 0,24%) atuam em segundos e com efeito bactericida sobre micoplasma e formas vegetativas de bactérias (na ausência de materiais orgânicos) (DYCHDALA, 2001; LEE; MILES; PERRY, 1985). Altas concentrações (1.000 ppm ou 1,0%) de cloro são necessárias para matar *Mycobacterium tuberculosis* usando o teste tuberculocida da AOAC (RUTALA; WEBER, 1991). Uma concentração de 100 ppm (0,1%) mata 99,99% dos esporos de *Bacillus subtilis* em 5 minutos (WILLIAMS; RUSSELL, 1991). Dois autores publicaram estudos demonstrando que 25 tipos de vírus foram inativados em 10 minutos com 200 ppm (0,2%) de cloro livre (KLEIN; DEFOREST, 1963). Alguns estudos demonstram a eficiência do hipoclorito de sódio diluído e de outros desinfetantes para inativar o vírus do HIV (SATTAR; SPRINGTORPE, 1991). A exposição de *Candida spp.* é inibida

após 30 segundos de exposição ao cloro (SILVERMAN *et al.*, 1999). Experimentos têm demonstrado que usando-se cloro livre na concentração de 100 ppm (0,1%) consegue-se matar *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em concentrações de 10^6 - 10^7 (RUTALA *et al.*, 1998) lembrando que se 1 ppm equivale a 1,0 mg por litro, 10.000 ppm equivalem a 1,0 % de cloro ativo disponível (não complexado com matéria orgânica).

1.10.5 Hipoclorito de sódio - usos

O hipoclorito de sódio (NaClO) é um desinfetante amplamente utilizado em hospitais, principalmente pela ação inativadora do HIV e do HBV (RUTALA *et al.*, 1998; ESTRELA *et al.*, 2003). Disponível na forma líquida sob diversas concentrações é um agente químico (biocida) de escolha para diversas aplicações: desinfecção de superfícies, de lavanderias, de centros de hemodiálise, odontologia e outras (KWOK; RALPH, 1984; MENTZ, 1982, RUTALA, 2005). O hipoclorito de sódio adicionado à água é transformado em ácido hipocloroso ($\text{NaClO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{NaOH}$) e sua eficiência depende da concentração de ácido hipocloroso não dissociado (HClO) na solução. Os compostos liberadores de cloro ativo têm ampla aplicação em diversas áreas. Especificamente em laboratório de análises clínicas, são apropriados para desinfecção em geral de objetos e superfícies inanimadas, inclusive as contaminadas com sangue e outros materiais orgânicos, e para recipientes de descarte de materiais (HOFFMAN, 1994). Em residências, as propriedades de limpeza e higiene do hipoclorito de sódio são úteis no assoalho, cozinha e superfícies em banheiros. Nas concentrações de 3 a 5% o hipoclorito de sódio tem sido comercializado por muitos anos como água sanitária e o seu consumo é altamente expressivo em toda a Europa. O seu desempenho para remover manchas e mau odor, bem como a sua condição de alvejar as roupas em lavanderias, decorrem do grande poder oxidativo (WENTZ; LLOYD, 1975).

A filtração e desinfecção da água por cloração tem sido responsável por grande parte dos 50% de aumento da expectativa de vida neste século. Este

fato levou a revista Life a citar a filtração e cloração da água como “O avanço mais significativo de saúde pública do milênio” (CHRISTMAN, 1998).

1.10.6 Ácido acético (vinagre)

O número de ácidos orgânicos conhecidos ultrapassa mil, dentre os quais está o ácido acético, pertencente à classe dos carboxílicos. O ácido acético representa um dos mais importantes ácidos desta classe. É um etanóico conhecido sob a forma de vinagre desde a antiguidade, e é difundido no reino vegetal em estado livre. O termo ácido acético vem do latim *acetum* e significa vinagre: do catalão *vinagre*, termo composto do radical *vin*, de vinho, e *agre*, - de sabor ácido. É um ácido orgânico com a fórmula estrutural CH_3COOH , que se produz pela fermentação (oxidação) do álcool etílico, por ação da bactéria *Acinetobacter aceti* ($\text{CH}_3\text{COOH} + \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{CH}_3\text{COOH}$). No estado anidro se solidifica a 16°C , em forma de cristais parecidos com gelo; por isso recebe o nome de ácido acético cristalizável ou ácido acético glacial. Seu peso molecular é de 60,05, com 40% de carbono, 6,71% de hidrogênio e 53,29% de oxigênio. É um líquido transparente e incolor, de cheiro forte, picante e irritante, paladar azedo; quando muito diluído em água tem sabor ácido. É miscível em todas as proporções com água, álcool, éter, carbono tetracloreto e glicerina; também dissolve fósforo e os ácidos halogênico e sulfúrico. É praticamente insolúvel em carbono dissulfídrico. Deve ser conservado em frascos bem fechados (MORRISSON; BOYD, 1983; BUDAVARI *et al.*, 1989).

Quando ingerido, o ácido acético ou vinagre (4,0 a 4,2%) provoca irritação severa da mucosa da boca e do trato intestinal, com vômito, hematêmese, diarreia, colapso respiratório, uremia e morte. A exposição crônica pode causar erosão do esmalte dentário, bronquite e irritação ocular (RICHEY, 1986; BUDAVARI *et al.*, 1989).

A literatura refere o uso do ácido acético ou vinagre no tingimento de tecido de seda, como acidulante e como conservante de alimentos, solvente de goma, de resina, de óleos voláteis e de outras substâncias; como agente

desinfetante de artigos semicríticos; no tratamento de verrugas, nos acidentes caseiros como as queimaduras, e como agente antisséptico quando há suspeita de *Pseudomonas*. É largamente usado na síntese orgânica, nas formulações farmacêuticas e também como reagente químico industrial. A concentração habitualmente usada no tratamento de feridas é de 0,25%.

Um estudo *in vitro* com 20 cepas de *Pseudomonas spp.* isoladas de sítios cirúrgicos, e uma amostra padrão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), constatou que todas as cepas foram inibidas pelo ácido acético a 2,0, a 1,0, a 0,5, e a 0,25%, comprovando a eficácia do produto *in vitro* (ARAÚJO *et al.*, 1995).

A atividade bactericida da solução de hipoclorito de sódio acidificada é realçada pelo aumento dos níveis de ácido hipocloroso (HClO) dissociado. Estudos têm mostrado a utilidade como um poderoso desinfetante da solução de hipoclorito de sódio ajustada para o pH de 5,0 com HCl (OKUBO; URAKAMI; TAMURA, 1998). Em um estudo recente foi avaliado o efeito de diferentes ácidos sobre a atividade bactericida da solução ácida de hipoclorito de sódio e foi determinada a melhor concentração para o uso da solução de hipoclorito de sódio. O desinfetante preparado com hipoclorito de sódio e ácido acético mostrou alta atividade esporicida, o que não ocorreu com os ácidos fosfórico, fórmico, sulfúrico e outros. Alguns ácidos, como o cítrico e o láctico, quando combinados com o hipoclorito de sódio, não aumentam a atividade bactericida (HUROIWA *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Acondicionamento, armazenamento, manuseio, coleta, transporte e tratamento prévio antes do descarte final são diferentes etapas que devem ser observadas com atenção redobrada quando se trata de lixo biológico. O principal risco associado ao resíduo laboratorial de microbiologia é o infecto-contagioso. As principais categorias de doença ocupacional são causadas por exposição a poeiras, produtos químicos e agentes microbiológicos (HIRATA; MANCINI-FILHO, 2002). A segurança do operador é colocada em risco em todas as etapas do processo. Com relação ao meio ambiente, o pós-descarte pode ter impactos indesejáveis já demonstrados e publicados em outros países, incluindo-se o risco ao qual estão sujeitos os funcionários que operam os resíduos na fase final do processo (JOHNSON *et al.*, 2000). Outro aspecto relevante relaciona-se ao tratamento físico dos meios de cultura pela autoclavação. O odor desagradável, semelhante ao da putrefação, que emana durante a esterilização e a estocagem, torna o ambiente de trabalho insalubre. Os laboratórios de microbiologia, tanto no Brasil como em outros países, tratam os seus resíduos de acordo com normas estabelecidas. No Brasil, é o caso da RDC nº 306/2004, decretada pela ANVISA. As placas descartáveis, tubos e demais acessórios, como meios de cultura sólidos e líquidos contaminados, são acondicionados em sacos plásticos resistentes e autoclavados; desta forma, são remetidos ao lixo hospitalar (ANVISA, 2004). O plástico descartável esterilizado juntamente com o meio de cultura fica no meio ambiente por muitos anos; o meio de cultura, por sua vez, fica incorporado à matéria orgânica presente no lixo. Em países como o Canadá, repete-se a mesma rotina inicial de autoclavação e/ou desinfecção química, sendo que, na etapa final, os resíduos (meios de cultura autoclavados ou tratados quimicamente) são descartados na rede de esgotos (CANADIAN STANDARDS ASSOCIATION, 2005). Diversos autores em suas revisões, artigos e outros tipos de publicações, apresentam e discutem métodos de avaliação, e aspectos relacionados à validação e eficácia de biocidas, antissépticos e desinfetantes usados para reduzir a carga microbiana em superfícies ou em equipamentos

(HORTWITZ; LATIMER, 2005; RUTALA; WEBER, 2005; RUTALA; WEBER, 2004; COLE; RUTALA; SAMSA, 1988; COLE; RUTALA, 1988). O tratamento químico de resíduos de microbiologia e o seu destino final não têm sido descritos na literatura pesquisada.

Neste trabalho pretende-se estudar a questão do tratamento do resíduo microbiológico para contemplar uma exigência da legislação, e ao mesmo tempo analisar a questão da responsabilidade empresarial com a preservação ambiental. As normas ISO 14000 fomentam a prevenção das contaminações ambientais, orientam a estrutura organizacional, a forma de operação, armazenamento, recuperação e tratam também da disponibilização de dados e resultados. Estas normas visam claramente a um questionamento: “o que a organização faz para minimizar os efeitos nocivos ao ambiente causados pelas suas atividades?”. Neste contexto é inserido o descarte de material contaminado em laboratórios clínicos, assunto pouco discutido e explorado no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar um sistema alternativo automatizado de tratamento e de descarte de resíduos de microbiologia.

3.2 Objetivos específicos

Desenvolver uma metodologia específica para avaliar a eficácia de agentes químicos no tratamento de resíduos de microbiologia.

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) ou dose ideal (mínima concentração com segurança máxima) e o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio isolado e combinado com ácido acético necessários para reduzir a carga microbiana em meios líquidos, semi-sólidos e sólidos contaminados com microorganismos;

Desenvolver protótipo de equipamento automatizado para a redução da carga microbiana. Avaliar se o protótipo atende à resolução da ANVISA (RDC n° 306/2004) atingindo níveis aceitáveis (NÍVEL III).

Verificar a eficácia de sistema alternativo de tratamento de resíduos de microbiologia contaminados usando metodologia molecular (PCR em tempo real).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados para avaliar a sensibilidade dos microorganismos ao hipoclorito de sódio pelo método de difusão com Perfurador Circular de Ágar (PCA)

- PCA
- Microorganismos padrões (13 cepas) liofilizados provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL - São Paulo);
- Solução aquosa de hipoclorito de sódio a 12%;
- Água deionizada;
- Placa de Petri descartável de 140 x 15 mm;
- Meio de cultura: Ágar de Mueller Hinton (Bio-RAD, USA);
- Pipeta de volume variável (1 a 100 µL)
- Agulha descartável (25x0, 7 mm);
- Estufa bacteriológica;
- Espectrofotômetro (Micronal, BRASIL)
- Paquímetro digital modelo S 225 (Sylvac, SWITZERLAND).
- Pipeta de 1,0 mL

4.2 Confeção do Perfurador Circular de Ágar

O molde de aço desenvolvido (Figura 1) para perfurar o meio de cultura, formando cavidades, foi criado com base em um modelo proposto em artigos sobre métodos para a detecção da sensibilidade a agentes tópicos (medicamentos). Estes artigos relatam experimentos no tratamento de agentes microbianos isolados de pacientes com feridas infectadas provocadas por queimaduras (NATHAN; LAW; MURPHY, 1978; VU *et al.*, 2002). Nos trabalhos citados e em outros, foram usados cânulas individuais de metal ou canudos para aspirar refrigerante como ferramenta para perfurar o meio de cultura e formar as cavidades (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2005; GROVE; RANDALL, 1955). O instrumento desenhado e criado para o método que

propomos é composto de 8 perfuradores (peças vazadas) com 6 mm de diâmetro e foi denominado de Perfurador Circular de Ágar (PCA).

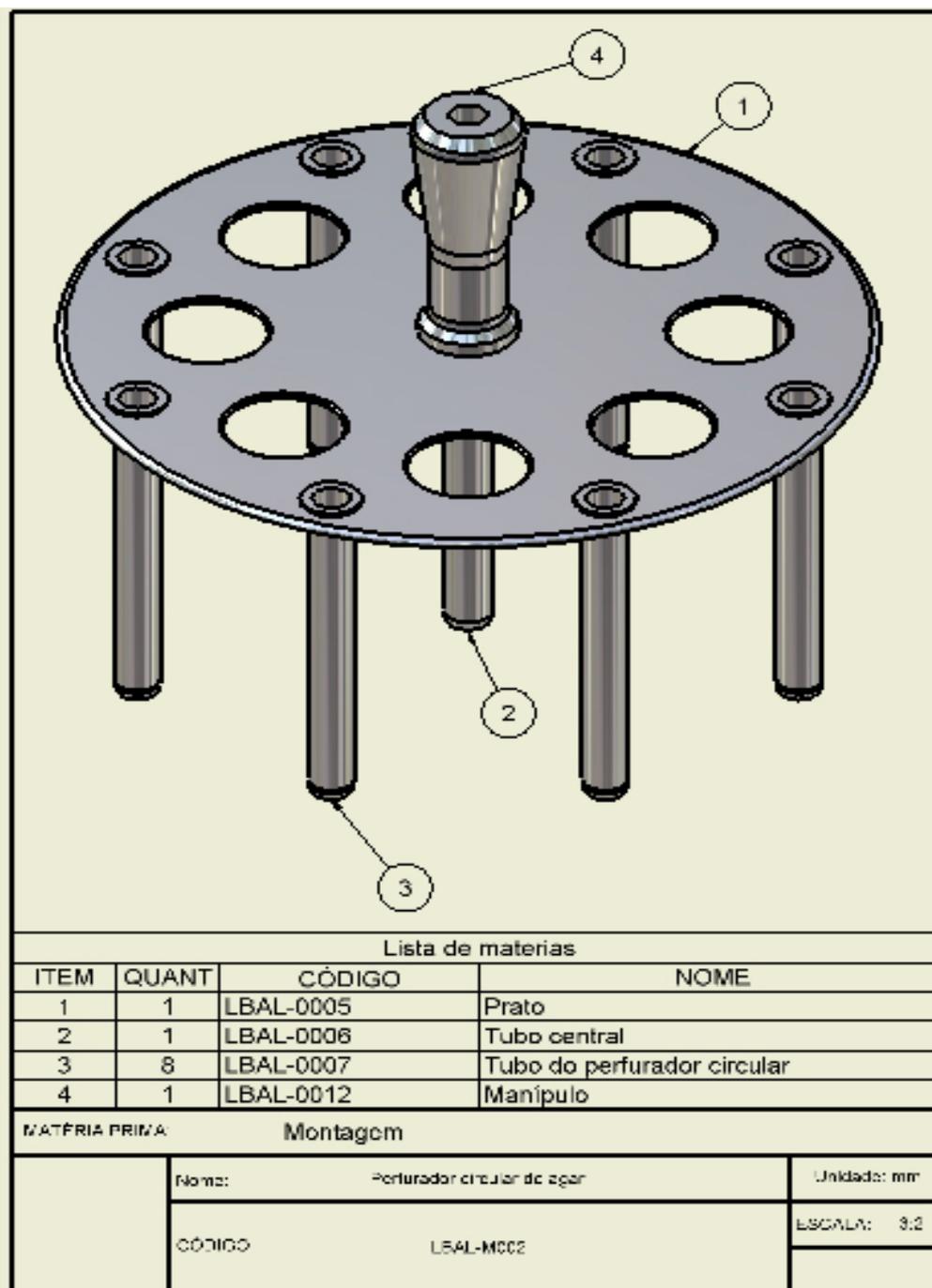


Figura 1. Molde de aço para perfurar o meio de cultura (Ágar de Müller Hinton) ou Perfurador Circular de Ágar (PCA).

4.3 Método de difusão para estudo e sensibilidade utilizando perfuração circular de ágar

Foram preparadas 140 placas de Petri de poliestireno medindo 140 x 15 mm, contendo Ágar de Müller Hinton. Cada placa foi inoculada com uma suspensão de microorganismo padrão, conforme relação descrita na Tabela 1. Foram usadas 13 cepas de microorganismos e uma mistura homogênea delas. O teste foi realizado em 10 replicatas para cada microorganismo e para a mistura de todos os microorganismos. Para testar a sensibilidade ao agente químico (hipoclorito de sódio) foi usado o princípio do método de difusão em ágar, preconizado para estudo da sensibilidade aos antimicrobianos (NCCLS, 2001), usando poços perfurados no ágar como suporte do agente químico, em vez de papel-filtro.

Tabela 1. Cepas de microorganismos liofilizados provenientes da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (IAL - São Paulo) e cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA)

Microorganismos	ATCC/IAL	Sigla	Identificação
1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC	AC	19606
2. <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	BS	19659
3. <i>Candida albicans</i>	ATCC	CA	10231
4. <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	EF	29212
5. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	EC	25922
6. <i>Proteus mirabilis</i>	ATCC	PM	25933
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	PA	27853
8. <i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC	ST	14028
9. <i>Serratia marcescens</i>	ATCC	SM	4133
10. <i>Shigella flexneri</i>	ATCC	SF	12022
11. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	SAATC	25923
12. <i>Staphylococcus aureus</i>	IAL	SA1607	1607
13. <i>Staphylococcus aureus</i>	IAL	SA1604	1604

Para padronizar a densidade do inóculo foi usada uma solução-controle de BaSO₄ com a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland de 0,5. A solução 0,5 da escala de McFarland foi preparada acrescentando uma alíquota de 0,5 mL de BaCl₂ a 0,048 mol/L a 99,5 mL de H₂SO₄ a 0,18 mol/L. A densidade da turbidez foi medida usando espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm. Para cada bactéria (cepas-padrões) foram isoladas de três a cinco colônias da cultura semeada em ágar nutriente, que foram então transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo de soja tríplica. O caldo foi incubado a 36°C; após 24 horas a turbidez foi ajustada com salina estéril até obter a densidade óptica comparável ao tubo 0,5 da escala de McFarland, suspensão que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A suspensão ajustada do agente bacteriano foi semeada com *swab* em meio Ágar de Müller Hinton previamente preparado em placa de Petri, procurando-se assegurar distribuição homogênea do inóculo. Em cada placa, após a inoculação da bactéria e incubação durante 15 minutos a 36°C em estufa, o Ágar de Müller Hinton foi perfurado com o PCA. Ao mesmo tempo, foram preparadas soluções em 8 tubos de ensaio (12x75 mm) conforme seqüência: no primeiro tubo, 1,0 mL de hipoclorito de sódio a 12% e 2,0 mL de água deionizada, obtendo uma solução a 4%; nos tubos subseqüentes de números 2 a 8, foram pipetados 1,0 mL de água deionizada. Com uma pipeta de 1,0 mL foram realizadas diluições sucessivas, do primeiro até o oitavo tubo. Desta forma, as concentrações de hipoclorito de sódio ficaram assim distribuídas (por tubo): 1=4,0%, 2=2,0%, 3=1,0%, 4=0,5%, 5=0,25%, 6=0,125%, 7=0,062%, 8=0,031%, equivalentes a 4.000 ppm, 2.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62 ppm, 31ppm, respectivamente.

Foram aspirados 35 µL de cada solução aquosa de hipoclorito de sódio nas concentrações descritas, sendo estas alíquotas dispensadas nos 8 poços perfurados. Após a incubação a 37°C por 24 horas, a sensibilidade foi determinada pela medida em mm do diâmetro das zonas de inibição formadas ao redor de cada cavidade contendo as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (Figura 2). A mensuração dos halos de inibição formados foi realizada usando um paquímetro digital. Uma placa com 8

cavidades, acrescidas de solução fisiológica e sem inoculação de microorganismos, foi usada como controle negativo. As médias dos halos de inibição de crescimento para cada microorganismo e para a mistura deles são demonstradas nos resultados.



Figura 2. Padrão do halo de inibição formado ao redor das cavidades contendo soluções de NaClO de 0,031% a 4,0% após 24 horas da semeadura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, usando o método de difusão em poços circulares (PCA).

4.3.1 Materiais utilizados na avaliação da sensibilidade dos microorganismos à combinação de hipoclorito de sódio e ácido acético usando o método de difusão com PCA

- PCA;
- Microorganismos padrões (13 cepas) liofilizados provenientes da ATCC (Rockville, MD, USA) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL - São Paulo, SP);
- Solução aquosa de hipoclorito de sódio a 5% (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ);

-
- Solução de ácido acético a 4% (vinagre de álcool, Irmãos Bochi & Cia Ltda, Cascavel, PR);
 - Água deionizada;
 - Placa de Petri descartável de 140x15 mm;
 - Meio de cultura: Ágar de Mueller Hinton (Bio-RAD, USA);
 - Pipeta de 100 µL (vol. variável);
 - Agulha descartável (25x0,7 mm);
 - Estufa bacteriológica;
 - Paquímetro digital modelo S 225 (Sylvac, SWITZERLAND).

4.3.2 Procedimento do método por difusão para avaliação de sensibilidade de microorganismos à combinação de hipoclorito de sódio e ácido acético

Foram preparadas 140 placas de Petri de poliestireno 140 x 15 mm contendo Ágar de Mueller Hinton e inoculadas com uma suspensão de cada microorganismo padrão, conforme relação descrita na Tabela 1. Foram usadas 13 cepas de microorganismos e uma mistura homogênea delas. O teste foi realizado em 10 replicatas para cada microorganismo e para a mistura de todos os microorganismos. Para testar a sensibilidade ao agente químico hipoclorito de sódio combinado com ácido acético, foi usado o princípio do método de difusão em ágar, preconizado para estudo da sensibilidade aos antimicrobianos (NCCLS, 2001), usando poços perfurados no ágar como suporte do agente químico, em vez de papel-filtro. A seqüência do procedimento microbiológico é idêntica a descrito no ensaio 4.3. A partir de uma solução de NaClO a 5% e CH₃COOH a 4%, foram preparadas as soluções de trabalho com concentrações de 0,125 % a 1,0% e de 0,1% a 0,8%, respectivamente. São aspirados 35 µL de cada solução, sendo as alíquotas dispensadas em 4 poços perfurados no Ágar de Mueller Hinton, onde foi inoculada previamente a cepa-padrão do microorganismo. Em cada placa são adicionadas, nos outros 4 poços, as soluções de hipoclorito de

sódio (sem ácido acético) nas concentrações de 0,125 a 1,0% com a finalidade de comparar os diâmetros de inibição das duas soluções biocidas testadas (Figura 3).

Após incubação a 37°C por 24 horas, a sensibilidade foi determinada pela medida em mm do diâmetro das zonas (halos) de inibição formadas ao redor de cada cavidade contendo as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e ácido acético. A mensuração dos halos de inibição foi realizada usando um paquímetro digital. As médias dos halos de inibição de crescimento para cada microorganismo usado e para a mistura deles são demonstradas nos resultados.

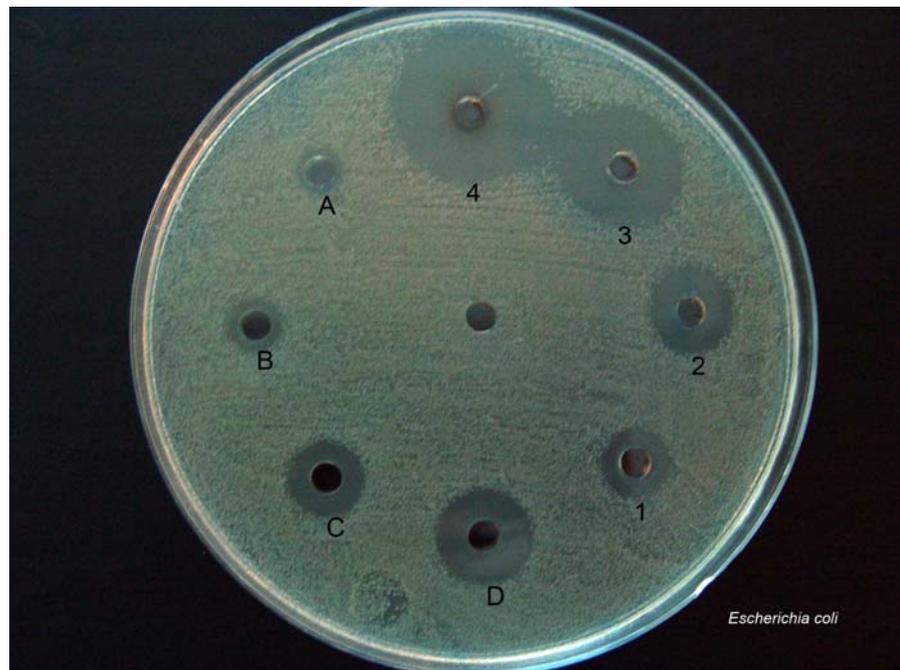


Figura 3. Padrão do halo de inibição de crescimento bacteriano formado ao redor das cavidades contendo soluções de NaClO em concentrações de, 0,125 a 1,0% (poços A, B, C e D) e NaClO acidificado com CH₃COOH de 0,1 a 0,8% (poços 1, 2, 3 e 4) após 24 horas da semeadura de *Escherichia coli* ATCC 25922, usando o método de difusão em poços circulares (PCA).

4.4 Método de difusão para estudo da sensibilidade dos microorganismos ao hipoclorito de sódio pelo método de difusão com Perfurador Linear de Ágar (PLA)

- Perfurador Linear de Ágar (PLA);
- Microorganismos padrões provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL);
- Solução aquosa de hipoclorito de sódio a 12%;
- Água deionizada;
- Placa de Petri descartável de 140x15 mm;
- Placa de poliestireno com 96 cavidades;
- Meio de cultura: Ágar de Mueller Hinton (Bio-RAD, USA);
- Pipeta automática multicanal de 1-100 µL (Labsystems, usa);
- Agulha descartável (25 x 0,7 mm);
- Estufa bacteriológica;
- Paquímetro digital modelo S 225 (Sylvac).

4.4.1 Confecção do Perfurador Linear de Ágar (PLA)

O Molde de aço (Figura 3) foi desenvolvido para avaliar a sensibilidade antimicrobiana do hipoclorito de sódio. Esta ferramenta foi criada com a mesma proposta do PCA, porém com diferenças na metodologia e na leitura dos resultados. Sua configuração baseia-se no princípio do Etest® (Figura 10). O Etest foi introduzido em 1988, como um método alternativo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ANDREWS; WISE, 2000), no qual tiras de papel eram impregnadas com concentrações diferentes de antimicrobianos. Este instrumento foi denominado Perfurador Linear de Ágar. É composto de 8 perfuradores (peças vazadas) com 6 mm de diâmetro. É demonstrado o procedimento da perfuração nas Figuras 5 e 6 para o preparo das cavidades onde serão adicionadas concentrações diferentes de hipoclorito de sódio (figura 7 e 8).



Figura 4. Perfurador Plano de Ágar (PLA).

Na Figura 5 é demonstrado o procedimento da perfuração do meio de cultura e na Figura 6 a retirada de meio com uma agulha hipodérmica de 25 x 0.7 mm, preparando, desta forma, 8 cavidades de 6 mm de diâmetro.



Figura 5. Perfuração do Ágar.



Figura 6. Retirada do ágar com agulha.

4.4.2 Procedimento do teste de sensibilidade dos microorganismos ao hipoclorito de sódio pelo método de difusão com PLA

Foram preparadas 140 placas de Petri de poliestireno 140 x 15 mm contendo Ágar de Müller Hinton e inoculadas com uma suspensão de cada microorganismo padrão, conforme relação descrita na Tabela 1. Foram usadas 13 cepas de microorganismos e uma mistura homogênea delas. O teste foi realizado em 10 replicatas para cada microorganismo e a mistura de todos os microorganismos. Para testar a sensibilidade ao agente químico (hipoclorito de sódio) foi usado o princípio do método de difusão em ágar, preconizado para estudo da sensibilidade aos antimicrobianos (NCCLS, 2001), usando poços perfurados no ágar como suporte do agente químico, ao invés de papel filtro. A densidade da turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm. Para cada bactéria (cepas-padrões) foram isoladas de três a cinco colônias de uma cultura semeada em ágar nutriente, transferindo-as para um tubo contendo 5 mL de caldo de soja tríptica. O caldo foi incubado a 36°C por 24 horas, e a turbidez foi ajustada com salina estéril até obter a densidade óptica comparável ao tubo 0,5 da escala McFarland, suspensão que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A suspensão do agente bacteriano ajustada foi semeada com *swab* em meios Ágar de Müller Hinton previamente preparados em placa de Petri, procurando-se assegurar distribuição homogênea do inóculo. Cada placa, após a inoculação da bactéria e incubação durante 15 minutos a 36°C em estufa, foi perfurada com o Perfurador Linear de Ágar (PLA). Ao mesmo tempo, em 8 tubos de ensaio (12x75 mm), foram preparadas soluções conforme seqüência: no primeiro tubo 1,0 mL de hipoclorito de sódio a 12% e 2,0 mL de água deionizada, obtendo uma solução a 4%, nos tubos subseqüentes de número 2 a 8, foram pipetados 1,0 mL de água deionizada. Com uma pipeta de 1,0 mL foram realizadas diluições sucessivas a partir do tubo número um até o oitavo tubo. Desta forma, as concentrações de hipoclorito de sódio ficaram assim distribuídas (por tubo): 1=4,0%, 2=2,0%, 3=1,0%, 4=0,5%, 5=0,25%, 6=0,125%, 7=0,062%, 8=0,031%. As soluções

foram distribuídas em placa de poliestireno de 96 cavidades (Figura 7). Usando uma pipeta multicanal de 8 ponteiros (Figura 7) foram aspirados 35 μ L de cada solução de hipoclorito de sódio nas concentrações descritas, e dispensadas nos 8 poços perfurados no Ágar de Mueller Hinton onde previamente foram inoculadas as cepas-padrões de microorganismos. Uma placa com 8 cavidades, acrescidas de solução fisiológica e sem inoculação de microorganismos, foi usada como controle negativo. Após a incubação a 37°C por 24 horas, foi realizada a leitura e a mensuração dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor das cavidades (Figura 9). O diâmetro do halo de inibição foi medido usando escala em mm, com um paquímetro digital.



Figura 7. Extração por pipetagem da solução de NaClO.



Figura 8. Adição de NaClO às cavidades.



Figura 9. Padrão do halo inibição formado ao redor das cavidades contendo soluções de NaClO de 0,031% a 4,0% , após 24 horas da semeadura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, pelo PLA.

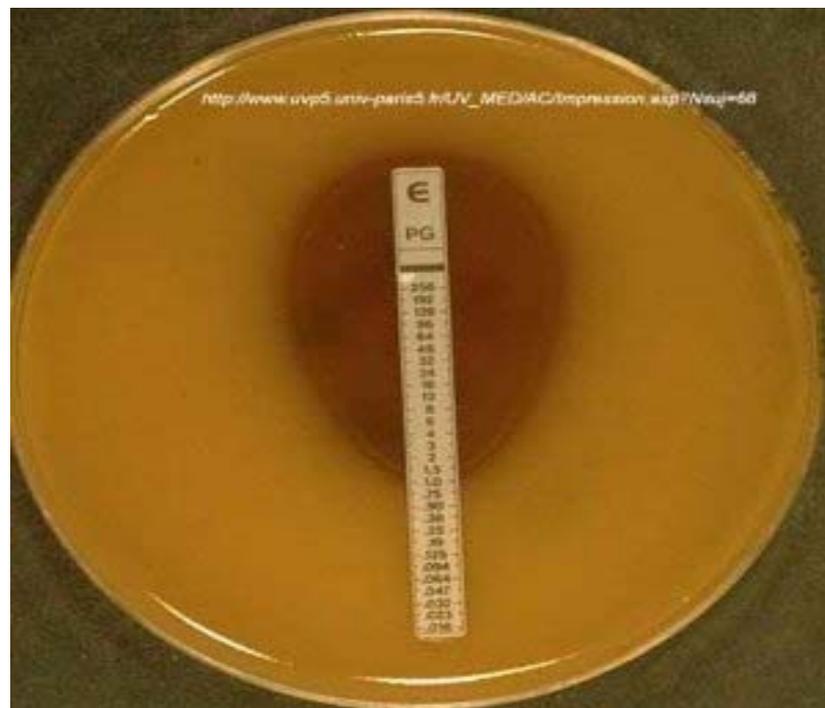


Figura 10. ETEST – fita de papel impregnada com suspensão decrescente de antimicrobiano; halo em forma de raquete.

4.5 Dosagem do hipoclorito de sódio: reagentes utilizados

Solução de iodeto de potássio (KI) a 10%, ácido acético glacial 1:3, tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,100 e amido a 0,5%.

Procedimento

Foram pipetados 10,0 mL de amostra para um balão volumétrico de 100,0 mL e completado o volume com água deionizada (diluição da amostra 1:10). Em um erlenmeyer de 250,0 mL adicionaram-se 5,0 mL da diluição da amostra (1:10), 10,0 mL da solução de KI a 10% e 20,0 mL de ácido acético 1:3 que foram titulados rapidamente com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,100 N até obter a cor amarela. A titulação foi iniciada imediatamente após a adição do ácido acético, para evitar a perda de iodo. Foram adicionadas 10 gotas do indicador amido a 0,5% e dada seqüência à titulação até que a cor azul desaparecesse. Anotou-se o volume gasto em mL (VG). Calculou-se o teor de hipoclorito de sódio em percentual, usando a fórmula conforme a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (NBR-9425 – ABNT – Solução de Hipoclorito de Sódio Comercial, determinação do teor de cloro ativo pelo método volumétrico – 1986 – adaptada) obtendo-se:

* V_{am} = volume da amostra e d = densidade

$$NaClO(\%) = \frac{VG \times 0,372}{V_{am} \times d} \times \frac{100}{10} \quad (1)$$

Sendo VG o volume gasto para a titulação, a constante V_{am} igual a 5 e a constante d igual a 1,22 para NaClO de 12% a 14%, pode-se reescrever Eq.(1) como:

$$NaClO(\%) = \frac{VG \times 0,372}{5 \times 1,22} \times \frac{100}{10} \quad (2)$$

Simplificando a Eq.(2) pela multiplicação dos termos constantes, obtém-se:

$$NaClO(\%) = \frac{VG \times 0,744}{1,22} \quad (3)$$

4.6 Metodologia estatística

Para comparação dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano foi aplicada a técnica de análise de variância simples. A utilização desta técnica se justifica, pois as observações foram realizadas de forma independente nos diferentes níveis de concentração e nos diferentes microorganismos. Além disso, o pressuposto de normalidade das observações também foi satisfeito. Foram feitas análises comparando as concentrações e os tipos de microorganismos. Para complementar as análises de variância, empregou-se o Teste de Comparação Múltipla de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

4.7 Avaliação da atividade bactericida do hipoclorito de sódio através da medida da fragmentação de DNA pela eletroforese

Foram utilizadas amostras de cepas-padrões de *Escherichia coli* (ATCC-25922) caracterizadas previamente. Estas cepas foram concentradas em soluções até o equivalente à turbidez do tubo 4 da escala MacFarland. Para cada amostra foi adicionado igual volume de solução salina a 0,9% ou hipoclorito de sódio (NaClO) em concentrações de 1% ou 0,03%. A reação

entre as soluções e os microorganismos foi interrompida após 30 segundos e seguiu-se a precipitação do DNA.

4.7.1 Precipitação de DNA bacteriano

Foi retirada uma alíquota de 500 μ L de cada reação. A seguir, utilizou-se o conjunto de diagnóstico comercial TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) para a precipitação do DNA bacteriano. Inicialmente, a amostra foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 5.000 gs. Em seguida, foi descartado o sobrenadante, adicionado 1 mL de Trizol e, após homogeneização, a mistura foi mantida em incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Após repouso de 3 minutos foram adicionados 200 μ L de clorofórmio à solução que foi então submetida à centrifugação por 15 minutos a 12.000 gs, a 4°C. Após completa remoção da fase aquosa, foram adicionados 0,3 mL de etanol a 100% e a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 2.000 gs por 5 minutos, a 4°C. O DNA precipitado é lavado com 1,0 mL de solução de citrato de sódio a 0,1M em etanol a 10%. Este material foi mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugado a 2.000 gs por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e este último passo foi repetido 2 vezes. Após o último descarte, o precipitado foi diluído em 0,2 mL de solução 8mM de NaOH.

4.7.2 Verificação de presença de material genético

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de Ágarose a 2%. Foram utilizados uma solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1%, e brometo de etídio. O gel de Ágarose foi exposto à fonte de luz UV para a revelação do material genético. É esperada a presença de uma banda fluorescente na parede do poço de aplicação do gel.

4.7.3 Amplificação de fragmento de DNA bacteriano

Para avaliar a integridade do material genético, foi realizada a amplificação de fragmento do DNA ribossômico. Para isto foi utilizada a amplificação com revelação em tempo real, com a presença de fluoróforo (SYBR®-Green). O método tradicional da reação em cadeia da polimerase (PCR) requer uma amplificação em termociclador seguida de uma separação em gel de eletroforese e exposição à luz UV. Este é um processo trabalhoso, lento e com risco elevado de contaminação do ambiente pelo produto final da PCR. Entretanto, o produto da PCR pode ser detectado por um marcador que se liga ao DNA. Foi utilizado o marcador SYBR-Green por ser de custo reduzido se comparado com as tradicionais sondas usadas na reação em tempo real (TaqMan®-PCR) (SHARMA; DEAN-NYSTROM; CASEY, 1999; OBERST *et al.*, 1998; FORTIN; MULCHANDANI; CHEN, 2001). Foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGC-3' e 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' para a amplificação de fragmento de DNA ribossômico (16S rDNA), conforme descrito previamente (MAYNARD *et al.*, 2005). Para a reação, foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante (SYBR®Green PCR Master Mix – Applied Biosystems, USA - número de catálogo 4309155). Na reação, devem-se observar os seguintes padrões de temperatura: 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 92°C por 2 minutos; 48,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após esta reação, foi realizada a curva de dissociação para observar a qualidade dos produtos de amplificação. Para confirmar o produto da PCR, estes produtos foram ainda revelados em eletroforese de gel de Ágarose e exposição à luz UV.

4.7.4 Contagem bacteriana pela PCR em tempo real

No presente trabalho, para formação de oligonucleotídeos iniciadores e sondas específicas para a quantificação por meio de *Real-Time* PCR, foi utilizada a região genômica relacionada ao RNA ribossômico (rRNA), em

particular, o RNA da subunidade pequena do ribossomo, denominada 16S em bactérias (GREISEN; LOEFFELHOLZ; LEONG, 1994; FELSKE; DE VOS; AKKERMANS, 2000; GRIFFITHS *et al.*, 2000). Cepas microbianas-padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 foram sub-cultivadas por 24 horas a 37°C em 10,0 mL de meio líquido (*brain heart infusion* Ágar) (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). O produto destas culturas foi lavado e ressuspenso em solução salina para a concentração final de aproximadamente 0,5 a 30 x 10⁸ células/mL, semelhante à dos tubos de números 1 a 10 da escala McFarland.

Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas foram utilizados de acordo com o descrito previamente (NADKARNI *et al.*, 2002). Foram eles:

- sense 5-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3;
- anti-sense 5-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3;
- sonda marcada (6-FAM)-5-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-(TAMRA).

4.7.5 Precipitação de RNA bacteriano

Para a extração de RNA, foi utilizado o método de extração por Trizol®MAX (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) conforme orientação do fabricante, que pode ser resumido assim: 1,0 mL da solução contendo bactérias é submetido à centrifugação a 6.000 gs por 5 minutos em temperatura constante de 4°C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento é ressuspenso com 200 µL de reagente estimulador de extração (presente no “kit” de extração) previamente aquecido a 95°C e mantido a esta temperatura por 4 minutos. A seguir, adiciona-se 1,0 mL de Trizol®, mantendo-se a solução por 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir adicionam-se 200 µL de clorofórmio, agita-se intensamente por 15 segundos e centrifuga-se a 12.000 gs, a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa de aproximadamente 400 µL é então separada e homogeneizada por 10 minutos com 0,5 mL de isopropanol gelado e mantida por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente, as amostras são centrifugadas a 12.000 gs, a 4°C por 30 minutos.

Em seguida é retirado o sobrenadante por inversão, o produto de extração é lavado com etanol 100%, com uma última centrifugação por 15 minutos a 7.500 gs, 4°C. Após cuidadosa retirada do sobrenadante, os tubos são deixados abertos para secar. Finalmente, 50 µL de água e 2,0 µL de inibidor de RNase (Invitrogen, 10777-019) são utilizados para a eluição final.

As amostras finais de rRNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, 18068-015) para excluir a presença de DNA genômico que possa interferir nas avaliações. Imediatamente antes do início das reações em tempo real, 10 U de DNase I são adicionadas a cada 10,0 µL de RNA. Após a adição de 1,0 µL de solução tampão, a solução é encubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, a reação é neutralizada com a adição de 1,0 µL de EDTA 20 mM e mantida às temperaturas de 37°C, por 1 minuto, e 65°C, por 10 minutos.

Para realizar as reações de PCR qualitativas e quantitativas foram utilizados reagentes EZ-TaqMan e o termociclador StepOne® (Applied Biosystem).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume de 50 µL, incluindo 10 µL de tampão 5 vezes concentrado, 0,1 µL (1 mM) de cada uma das dNTPs e 10 µL de amostras do RNA. Temperaturas de reação e ciclos para as amostras foram os seguintes: 50°C por 5 minutos, 65°C por 30 minutos, 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo que a detecção de fluorescência ocorreu nesta última etapa.

Foi utilizada a comparação de turbidez das soluções bacterianas com a equivalência da escala MacFarland para determinar as concentrações das soluções-padrão de bactérias utilizadas na quantificação por Real-Time PCR. Os valores do nível de detecção (Ct) foram fornecidos automaticamente pelo software do equipamento. Os valores de Ct são, tecnicamente, inversamente proporcionais à concentração inicial da amostra microbiana.

4.8 Descarte dos meios de cultura contaminados no desenvolvimento do equipamento (máquina)

4.8.1 Materiais usados

- Tampo de acrílico;
- Corpo da máquina;
- Tubulação de secagem;
- Turbina de secagem;
- Tubulação de saída;
- Dosadores;
- Válvula de drenagem;
- Câmara anticavitação;
- Tubulação de bombeamento;
- Cesto;
- Motor de 2 CV/monofásico/1.730 rpm;
- Lâminas de aço inox;
- Moto-bomba de 2CV/monofásica/1.730;
- Motor do secador de 1 CV/monofásico/1.730 rpm;
- Motor do cesto de 1 CV/monofásico/1.730 rpm;
- Bomba de esvaziamento – lavadora de roupa “Brastemp®” 220 v;
- Bomba de dosagem – lavadora de roupa “Brastemp®” 220 v;
- Eletroválvula de entrada de água – lavadora de roupa “Brastemp®” 220 v;
- Disjuntores de entrada: um bifásico e outro de 10 A , e disjuntor de força bifásico de 40 A;
- Chaves CLP;
- Fonte de corrente contínua;
- Fusíveis de proteção de 0,5 A;
- Transformador de 500 mA/127-220/12+12v;
- Retificador em ponte de 24 VCC/500 mA;
- Botões de função;
- Chave de manobra;

- Contadores (acionamento dos motores);
- Relês de sobrecarga.

4.8.2 Componentes básicos e funções da máquina

4.8.2.1 Introdução

Este capítulo apresenta, em ordem cronológica, as diferentes fases do desenvolvimento do equipamento e da metodologia de testes e análises, além dos resultados e conclusões de cada ensaio.

Os trabalhos relacionados a esta pesquisa, especificamente a construção do equipamento automatizado para o tratamento dos meios de culturas contaminados, tiveram início em agosto de 2004. Antes de se projetar o equipamento definitivo, testes preliminares foram executados para melhor compreensão do processo, utilizando para esse fim protótipos produzidos no Laboratório Álvaro e na oficina Rhenz (oficina mecânica) na cidade de Cascavel, Paraná.

Fase 1.0 As modificações da configuração inicial do plano original (Figura 11) são mostradas nas Figuras 12 e 13. Foi usado como recipiente para acondicionar a solução de hipoclorito de sódio um tambor de metal com capacidade para 200 litros (dimensões 99 x 63 cm). Na parte interna do tambor, foi colocado um cesto de metal (fios cobertos com plástico PVC) de forma circular para acondicionar as placas e meios de cultura. Este tambor é movimentado em sentido rotacional, manualmente no primeiro momento e, a seguir, por um motor acoplado (Figura 12).

Resultados: Observou-se oxidação de todos os componentes e o descolamento dos meios de cultura foi parcial (30%). Este resultado foi considerado insatisfatório.

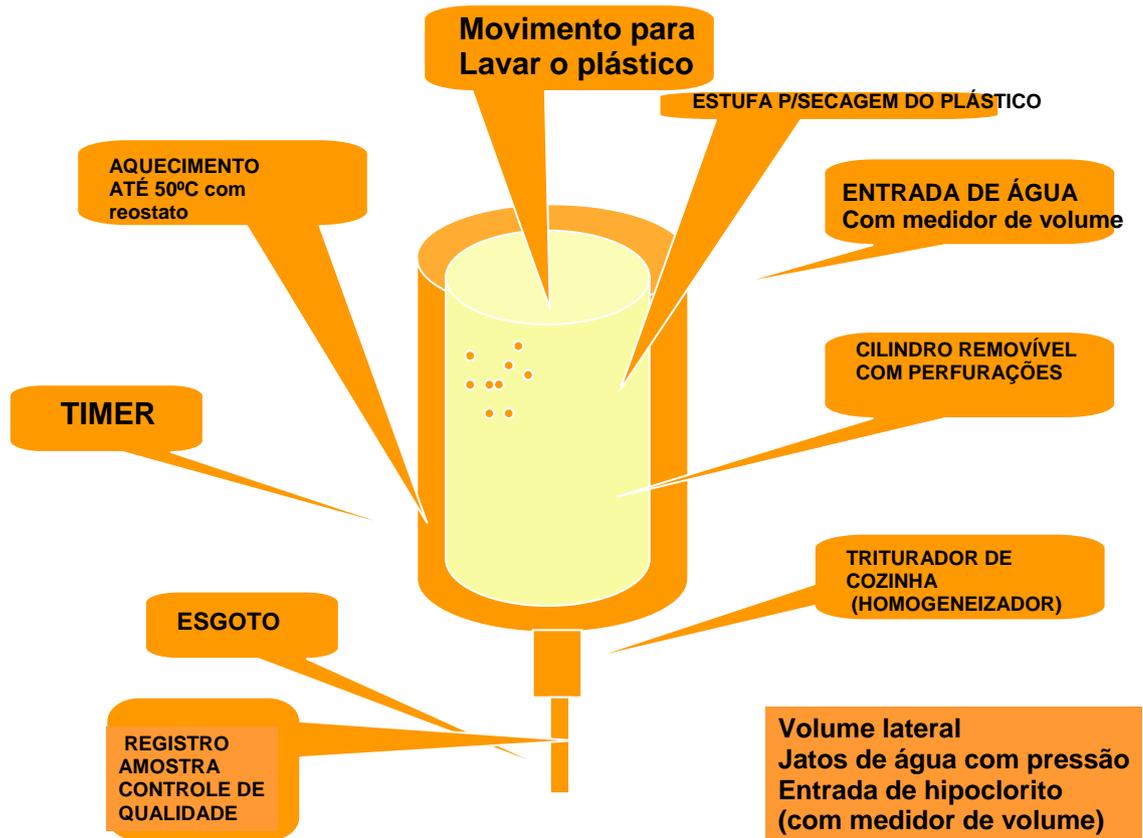


Figura 11. Apresentação esquemática do projeto original para a construção da máquina.



Figura 12. Tambor de metal com cesto cilíndrico operado manual e mecanicamente.

Fase 1.1 Devido aos resultados obtidos na Fase 1.0 optou-se por usar como recipiente um tanque plástico de lavar roupa (Tanque Wanke). Esta opção apresentava duas vantagens: sua constituição física (plástica) e o turbilhonamento da água (Figura 13). Placas com meios de cultura estéril foram deixadas em repouso em solução de hipoclorito a 1,0% durante 4 horas e, na seqüência, o tanque foi ligado durante 20 minutos.

Resultados: Um dos objetivos foi alcançado: as placas ficaram limpas, mas totalmente estilhaçadas devido ao contato mecânico agressivo com as pás da hélice no momento do turbilhonamento. Devido ao choque e à solução de hipoclorito de sódio, a borracha que protege as pás da hélice foi destruída parcialmente e inúmeros pedaços de borracha de cor preta ficaram em suspensão.



Figura 13. Tanque de lavar roupa com cesto de metal.



Figura 14. Tanque de lavar roupa com manivela.

Fase 1.2 Passo seguinte: o experimento anterior foi repetido, acrescentando-se uma proteção para as pás da hélice, com a finalidade de evitar o choque mecânico.

Resultados: Somente 50% das placas apresentaram-se totalmente limpas. Em função do movimento rotativo aspirativo, as placas eram tragadas pela turbina, dificultando, assim, a lavagem.

Fase 1.3 Para resolver o problema foi criado um cesto (Figura 12) para ser submetido a movimentos rotacionais com uma manivela (Figura 14) turbilhonando, assim, a água por trinta minutos.

Resultados: Foi observada melhora acentuada no número de peças limpas (80%), porém a partes inferiores das placas se encaixavam umas nas outras atrapalhando a limpeza. Apesar disto, o objetivo desta fase foi alcançado. Os ensaios realizados foram encorajadores e a experiência adquirida contribuiu para o desenvolvimento de um novo desenho.

Fase 1.4 As placas e meios de cultura em solução aquosa foram aquecidos a 65°C e, na segunda etapa, a 95°C durante duas horas.

Resultados: O processo de aquecimento a 65°C não alterou o resultado e, a 95°C, as placas ficavam esbranquiçadas, perdendo-se a possibilidade de reciclá-las, apesar da eficiência da limpeza. Foi abandonada, assim, a opção de acrescentar calor para auxiliar o processo.

Fase 1.5 Voltou-se a utilizar o tambor de metal, com uma cesta contendo as placas e meios, sem a solução de hipoclorito de sódio, usando somente água com a finalidade específica de limpar. Foi acrescentado, além do movimento rotacional do cesto, um jato de água sob pressão.

Resultados: Após 5 minutos de lavagem, 95% das placas ficaram limpas. Concluiu-se que o processo de rotação com jatos de água era eficiente e assim permitiria o aperfeiçoamento do sistema para atingir a meta de 100% de limpeza.

Fase 1.6 Na seqüência, com o objetivo de aumentar a velocidade da limpeza, as placas foram separadas (tampa e fundo) e acrescentaram-se oito bicos de lavagem acoplados a uma bomba de alta pressão de múltiplo estágio.

Resultados: Após 5 minutos, 100% das placas ficavam totalmente limpas. Concluiu-se que a máquina deveria ter seis a oito bicos para o enxágüe, um cesto removível com dois compartimentos e um triturador de resíduos para destruir completamente papéis das etiquetas auto-adesivas e discos de antibióticos. Para resolver o problema da oxidação, todos os materiais usados deveriam ser fabricados em aço inoxidável ou plástico.

Fase 1.7 Após as fases (1.0 a 1.7), alguns aspectos já estavam definidos e outros tinham de ser analisados de forma conjunta. Os elementos e funções importantes (13 itens) são listados abaixo e uma nova proposta foi desenhada (Figura 15).

1. Sistema de recirculação da solução de NaClO;
2. Trituração de papéis e/ou restos de plástico (triturador comercial ou construção de um modelo apropriado para o sistema);
3. Cesto removível com dois compartimentos;
4. Secagem das placas após lavagem – sistema a frio e ventilação forçada ou a quente;
5. Abastecimento de água, NaClO e CH₃COOH;
6. Protótipo em aço inoxidável ou plástico;
7. Cesto removível;
8. Velocidade do cesto (fixa ou variável);
9. Bicos de lavagem (6 ou 8);
10. Fechamento hermético com tampa de acrílico ou vidro;
11. Saída para amostra na tubulação de esgoto;
12. Número de motores (7);
13. Tanque de lavagem de aço inox (modelo comercial).

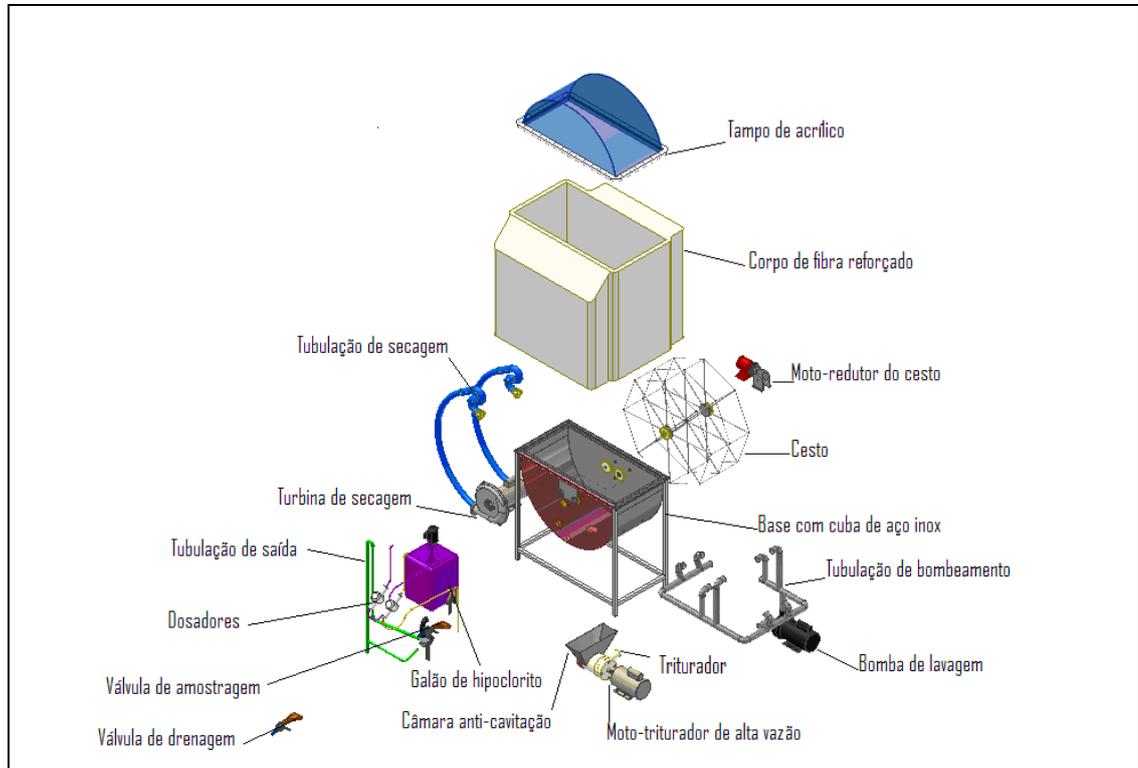


Figura 15. Esquema expandido do projeto do sistema automatizado de tratamento e descarte de meios de cultura contaminados.

4.8.2.2 Componentes básicos e detalhamento da máquina (Figura 15)

Tampo de acrílico

O tampo de acrílico serve para abrir e fechar a máquina, possibilitando a colocação e retirada de placas; é transparente para visualizar o processo e verificar sua eficácia ou ocorrências indesejáveis durante o funcionamento do rotor e jatos da solução biocida. É adaptado ao corpo da máquina, e se fecha hermeticamente ao ser pressionado sobre uma base de borracha. O tampo foi construído de forma artesanal, em acrílico.

Corpo da máquina - base com cuba de aço inox

É a estrutura central da máquina; consiste em uma armação de aço à qual se fixa uma cuba de aço inox. É a câmara na qual ocorre a limpeza dos materiais. Foi produzido de forma artesanal.

Tubulação de secagem

Duas mangueiras de poliestireno, uma para a entrada e outra para a saída do ar. Têm a função de conduzir o ar na secagem dos materiais plásticos.

Turbina de secagem

Dispositivo que movimenta o ar na secagem dos materiais plásticos. É acionado pelo motor de secagem.

Tubulação de saída

A tubulação de saída serve para a retirada da solução biocida e dos meios de cultura após o processo de redução da carga microbiana. Este material tratado é descartado na rede coletora de esgoto. Estas tubulações são conhecidas comercialmente como “mangueiras cristal”.

Dosadores

São elementos de medição, com a finalidade de medir o volume de água, hipoclorito de sódio e ácido acético a ser usado. Há um dosador para cada elemento.

Válvula de amostragem

É uma via de saída de material que permite a retirada de amostras de meios de cultura homogeneizadas e tratadas, sem interferir no processo. Usada para fazer o controle de qualidade pós-tratamento.

Válvula de drenagem

É um mecanismo semelhante à válvula de amostragem, porém tem como função esgotar a máquina.

Câmara anticavitação

Esta parte da máquina corresponde apenas a uma conformação da entrada do triturador, que permite eliminar problemas com cavitação na entrada da bomba, problemas estes que reduzem a vida útil da bomba e seu rendimento.

Tubulação de bombeamento

É a tubulação que conduz a água da bomba até os bicos de lavagem; os tubos são feitos em aço inox. É utilizado um conjunto de tubos soldados artesanalmente.

Cesto

É uma armação circular de barras de aço inox que tem a finalidade de conter as placas enquanto giram durante a lavagem; é fechado por uma tela plástica de PVC. O cesto contém dois compartimentos.

4.8.3 Motores

Os motores são responsáveis por transformar energia elétrica em movimento, por isso são de fundamental importância. Foram utilizados quatro motores de corrente alternada e um de corrente contínua.

Motor do triturador

Motor de 2 cv/monofásico/1.730 rpm acoplado a seis lâminas de aço inox dentro de um corpo de nylon com quebra-turbulência; tem como finalidade triturar corpos sólidos ou gelatinosos, como pedaços de papel utilizados na identificação de placas, discos de antibióticos ou partes do meio de cultura utilizado nas placas.

O triturador possui a particularidade de triturar os subprodutos sem causar perda de carga na tubulação.

Moto-bomba

Motor de 2 cv/monofásico/1.730 rpm montado em uma bomba com fluxo máximo de 30 mil litros/hora e 12 metros de coluna d'água de pressão; tem como finalidade bombear a água do molho e a água limpa para a limpeza das placas.

Motor do secador

Motor de 1 cv/monofásico/1.730 rpm, montado sobre um caracol de turbina, tem como finalidade secar as placas antes de serem retiradas da máquina, facilitando a reciclagem.

Motor do cesto

Motor de 1/2 cv/monofásico/1.730 rpm, tem como finalidade girar o cesto com as placas e meios de cultura.

Bomba de esvaziamento

Bomba de lavadora de roupa "BRASTEMP®" 220 v, tem como finalidade esvaziar a bacia de lavagem.

Bomba de dosagem

Bomba de lavadora de roupa "BRASTEMP®" 220 v, tem como finalidade aspirar os agentes químicos e transferi-los para o corpo da máquina.

4.8.4 Eletroválvula de entrada de água

Eletroválvula "BRASTEMP®" 220 v, tem como finalidade medir a água que entra na máquina para preparar a solução de biocida.

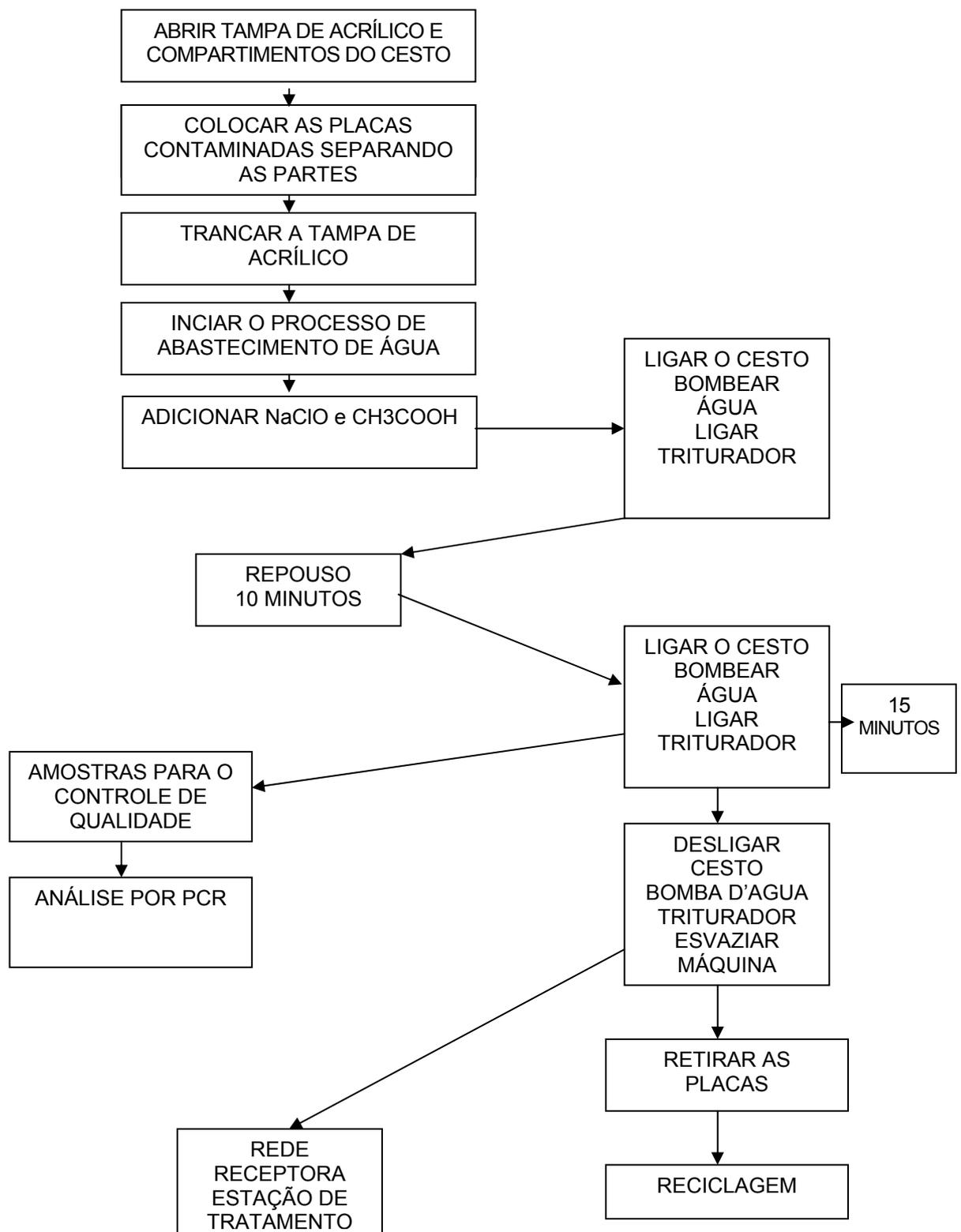


Figura 16. Esquema do procedimento operacional da máquina.

4.8.5 Painel de controle da máquina (Figura 17)

O painel de controle adotado é um arranjo que permite viabilizar as rotinas de funcionamento. É composto de um controlador lógico programável (CLP), como item principal de comando, que permite a alteração de qualquer lógica de funcionamento para adequar a rotina que será adotada.

As rotinas basicamente são seqüências de acionamentos temporizados, permitindo diferentes combinações de atuadores.

As dimensões do painel são: 200 x 300 x 400 mm.

4.8.5.1 Componentes do painel de controle

Disjuntores de entrada

São dois - um para proteção e manobra da alimentação dos componentes de comando como: botões, chave, CLP e fonte de corrente contínua, e outro para proteção e manobra dos elementos de corrente elevada – força / acionamento de motores. O disjuntor de comando é bifásico e de 10 A e o disjuntor de força é bifásico de 40 A.

Fusíveis de proteção

Diferentes dos disjuntores, os fusíveis têm a função única de proteger o circuito, não permitindo a manobra, porém servindo para ramificar os circuitos de forma eficiente e barata, além de ocupar pouco espaço. Foram utilizados oito fusíveis de 0,5 A, nas saídas do CLP, e um fusível de 0,5 A para a alimentação do CLP.

Transformador

O transformador tem a função de modificar o valor da tensão e da corrente; foi utilizado um modelo de 500 mA/127-220V/12+12v para reduzir o valor da tensão de entrada de 220v para 12v.

Retificador em ponte

Os retificadores em ponte têm a finalidade de transformar a corrente alternada que sai do transformador em corrente contínua, possibilitando a alimentação do CLP. Foi utilizado um modelo de 24VCC/500mA.

Botões

Os botões têm a função de possibilitar a intervenção do operador. Foram instalados nove botões.

Chave de manobra

As chaves de manobra provocam intervenções no processo que são mantidas, de modo diferente dos botões que apenas dão um pulso de comando. Foi colocada uma chave de manobra para possibilitar o funcionamento da máquina em manual/automático.

Contatores

Os contatores servem para acionar mecanismos que demandam corrente elevada ou para efetuar um comando remoto. Foram utilizados quatro para o acionamento dos motores que funcionam com correntes elevadas.

Relês de sobrecarga

Estes têm a função de proteger o motor, desligando o circuito de força no momento em que eventualmente surgirem alterações na voltagem da corrente elétrica. Foram utilizados quatro: um para cada contador.



Figura 17. Painel de controle da máquina.

Nomenclatura no painel de comando (Figura 17)

- | | | | |
|--------------------------|--------|-------------------|---------|
| ▪ Chave manual utomático | - M/A | ▪ Botão de parada | - Para |
| ▪ Botão secador | - Séc | ▪ Botão rotina 1 | - Rot 1 |
| ▪ Botão triturador | - Trit | ▪ Botão rotina 2 | - Rot 2 |
| ▪ Botão cesto | - Cest | ▪ Botão rotina 3 | - Rot 3 |
| ▪ Botão moto-bomba | - Bomb | ▪ Botão rotina 4 | - Rot 4 |



Figura 18. Fotografia do sistema automatizado de tratamento e descarte de meios de cultura contaminados.

4.8.5.2 Procedimento operacional do SADEMC (Figuras 16 e 18)

O tampo de acrílico que abriga o cesto de plástico (cor azul) dividido em dois compartimentos é aberto. A seguir, após terem sido separadas suas 2 partes (tampa e base com meio de cultura contaminados), as placas são colocadas no cesto, cada parte sendo depositada em um compartimento. Este procedimento evita que durante a lavagem a tampa torne a se acoplar à base, impedindo a lavagem e desinfecção das mesmas. O cesto e a tampa de acrílico da máquina são fechados. A partir deste momento o operador não tem mais contato com o sistema. Através de comando externo e medidores de volume (dosadores tipo hidrômetro) são injetados 50 litros de água, 2,1 litros de NaClO a 12% e 2,0 litros de CH₃COOH a 10,0% , adicionando-se a seguir 48 litros de água para atingir o volume final de 100 litros da solução biocida. Liga-se a máquina para girar o cesto e neste momento os bicos de jato de alta pressão são acionados juntamente com o triturador. Desta forma, a solução biocida é bombeada continuamente para os 8 bicos (sob pressão), lavando as placas com jatos. O triturador situado na base da máquina homogeneiza a mistura e fraciona os pedaços de papéis ou discos de antibiótico presentes nas placas. O tempo de operação da máquina foi

determinado avaliando-se de minuto a minuto até a completa limpeza das placas. Após 15 minutos de operação a máquina é desligada e uma amostra da mistura é coletada para o controle de qualidade (avaliação da eventual presença de bactérias viáveis). O procedimento completo da máquina foi repetido 5 vezes, avaliando: tempo do processo, rotações do cesto, volume da carga, número de placas 90 x 15 mm e 120 x 15 mm, peso dos meios de cultura contaminados e peso da carga total.

4.8.6 Avaliação microbiológica dos resíduos pós-tratamento com o biocida e o SADEMC

4.8.6.1 Materiais usados

- Hipoclorito de sódio a 10% (Vetec Química Fina Ltda – RJ);
- Ácido acético a 9,75% (ácido acético a 4.000 ppm - Indústria e Comércio Chemin – PR);
- Placas de Petri 140 x 15 mm (poliestireno);
- Placas de Petri 90 x 15 mm (poliestireno);
- Liquidificador (capacidade de 1.000 mL);
- Copo Becker forma baixa graduado Griffin de 500 mL (marca Schott);
- Bastão de vidro;
- Seringas descartáveis de 10,0 mL (Becton Dickinson);
- Meios de cultura Cled, Mac Conkey, Müller Hunton, Brain Heart Infusion Broth, Ágar Sangue;
- Bactec Plus - Aerobic/F (Becton Dickinson);
- Equipamento Bactec (Becton Dickinson);
- Cepas de microorganismos liofilizados provenientes da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (IAL - São Paulo) e cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) (Tabela 1).

4.8.6.2 Ensaio microbiológico da atividade bactericida do biocida combinado (NaClO e CH₃COOH)

As cepas-padrões (Tabela 1) foram cultivadas em ágar nutriente (Difco USA) e incubadas a 36°C em estufa durante 24 horas. Em seguida, 5,0 mL da cultura foram centrifugados e ressuspensos em salina, sendo ajustadas ao tubo 10 da escala MacFarland (30×10^8 UFC/mL). O experimento para determinar a atividade bactericida do biocida foi preparado conforme descrito a seguir:

Quatro alíquotas de 20 µL (30×10^8) da suspensão bacteriana (tubo 10 da escala MacFarland) foram misturadas com 200 µL da solução biocida de NaClO a 250 ppm e CH₃COOH a 200 ppm, e deixadas em repouso a 25°C durante os tempos zero, 5, 10 e 30 minutos, respectivamente. Após estes períodos foram acrescentados 200 µL de tiosulfato de sódio a 0,6% para neutralizar o efeito do biocida. Em seguida, a mistura foi semeada em ágar nutriente, com alça calibrada, para contagem das bactérias sobreviventes. As placas foram incubadas aerobicamente por 24 horas a 37°C (KUROIWA *et al.*, 2003).

4.8.6.3 Ensaio microbiológico da atividade bactericida do biocida (NaClO e CH₃COOH) após tratamento com o SADEMC

A capacidade máxima da máquina (SADEMC) é de 100 litros de solução biocida e 138 placas de Petri (90 x 15 mm), com peso total (placas e meios contaminados) de 10,72 kg, sendo 4,62 kg de meios de cultura e 6,10 kg de placas, carga acondicionada em caixa de plástico com dimensão que comporta 56 litros (Figura 19). Os testes microbiológicos foram realizados usando uma proporção reduzida da carga descrita. Assim, foram preparadas diversas placas contaminadas com as 13 cepas e a mistura delas (Tabela 1). Após 24 horas em estufa a 36°C os meios contaminados foram separados das placas, acondicionados em um Becker forma baixa graduado Griffin

de 500 mL (marca Schott) e homogeneizados com bastão de vidro. Para o controle positivo foram pesados 9,24 g da mistura homogeneizada de meios e bactérias, que foi diluída em 200 mL de água deionizada. Para o teste, foi utilizada a mesma quantidade (9,24 g), mas diluída em 200,0 mL de biocida (NaClO a 120 ppm e CH₃COOH a 100 ppm). Em seguida, as misturas foram trituradas em um liquidificador (procedimento que simula o SADEMC) e, posteriormente, coletadas amostras de 10 mL em seringa descartável com agulha, nos tempos 5, 15, 30 e 60 minutos (tempo de contato com o biocida do meio de cultura contaminado). As amostras foram injetadas nos frascos Bactec Plus – Aerobic (Figura 19), compostos de caldo de soja tripsicaseína, hemina, polianetol, sulfato de sódio e resinas aniônicas e catiônicas com ação neutralizante sobre os antibióticos (Becton Dickinson) e incubados no sistema Bactec (Figura 21) 9050® (Becton Dickinson and Company) por um período máximo de 7 dias ou até a detecção da positividade, conforme instruções do fabricante (LARGURA *et al.*, 2005). Seguindo o mesmo protocolo descrito, reduziu-se o volume das amostras (meios contaminados e biocida) para 1,0 mL que foram em seguida injetadas nos frascos Bactec Plus e incubadas no sistema Bactec 9050 (Figura 21). Este procedimento de redução do inóculo para 1,0 mL baseia-se no mesmo critério usado para amostras clínicas (secreções purulentas) quando o paciente está sob vigência de antimicrobianos. A redução da quantidade de amostra semeada em meios líquidos favorece o crescimento bacteriano porque a concentração de antimicrobiano eventualmente presente na amostra pode inibir o crescimento do agente patogênico envolvido na infecção.

4.8.6.4 Ensaio por PCR em tempo real após tratamento com o SADEMC

Além da avaliação por cultura descrita acima, foram separadas duas alíquotas de 1,0 mL para cada tempo de exposição ao SADEMC e também 2 alíquotas de 1,0 mL da mistura para os controles positivos. Uma alíquota seguiu para a realização direta de quantificação de carga microbiana por PCR

em tempo real e outra alíquota foi inoculada nos frascos Bactec Plus – Aerobic e mantida em incubação por 18 horas, quando 1,0 mL foi retirado para precipitação de RNA e quantificação por *Real-Time* PCR.



Figura 19. Carga de placas com meios de cultura contaminados a serem processados no SADEMC.



Figura 20. Frasco de cultura aeróbico C/F (Becton Dickinson, USA).



Figura 21. Instrumento de monitoramento contínuo de cultura de sangue modelo 9050 (Becton Dickinson, USA).

4.8.6.5 Avaliação da eficiência do SADEMC para redução da carga bacteriana, através da técnica de PCR em tempo real

Para avaliar a eficiência do sistema SADEMC, foi realizada a quantificação a partir do rRNA em tempo real dos microorganismos presentes em meios de cultura provenientes de laboratório de microbiologia clínica. Uma carga de meios de cultura contaminados (4,5 a 5,0 Kg), acondicionados em placas de Petri de poliestireno foi colocada no SADEMC, em seguida acrescentaram-se 100 litros de água. Após 15 minutos de agitação contínua (jatos de água sob pressão, rotação e trituração) foi retirado 1,5 mL desta solução para a quantificação bacteriana inicial (pré-tratamento). Na seqüência foram acrescentados NaClO e CH₃COOH o suficiente para obter a concentração de 0,250% (250 ppm) e 0,200% (200 ppm) respectivamente. Após 15 minutos de funcionamento do SADEMC foi coletado 1,5 mL de uma segunda amostra (pós-tratamento). Este procedimento foi realizado em 10 replicatas. Após o tratamento todas as amostras foram submetidas a cultura em BACTEC conforme experimento descrito no item 4.8.6.3, pág. 68-69.

5. RESULTADOS

5.1 Comparação entre os resultados obtidos pelo método PLA

Na Tabela 2 é apresentado um quadro-resumo de diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos para todas as concentrações de hipoclorito de sódio e para os 13 tipos de microorganismos e sua mistura pelo método PLA. Para todas as cepas, o número de amostras (N) é 10. A coluna M apresenta as médias e a coluna DP os desvios-padrão.

Tabela 2. Resumo dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos para todas as concentrações de hipoclorito de sódio pelo método PLA.

Concentração	0,031%		0,062%		0,125%		0,250%		0,500%		1,00%		2,00%		4,00%	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP								
1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	0,00	0,00	8,95	0,50	15,12	1,59	24,77	1,80	34,48	2,04	43,24	2,95	48,01	3,27	48,58	3,49
2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	0,00	0,00	9,53	0,42	18,45	1,42	27,60	1,15	38,47	1,52	45,60	0,56	48,41	0,80	49,17	0,84
3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	15,28	4,05	28,02	4,76	39,62	4,87	50,46	4,59	57,62	4,52	62,67	3,06	65,18	2,58	65,95	3,30
4. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,00	0,00	10,53	1,26	17,40	2,07	25,24	2,36	34,14	2,76	40,75	1,84	45,80	2,43	45,33	2,71
5. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,00	0,00	9,66	0,84	16,26	1,57	26,74	1,71	35,82	1,73	43,04	1,57	47,50	1,37	47,38	1,45
6. <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	0,00	0,00	9,30	0,71	16,97	1,65	28,02	1,43	37,73	2,83	44,40	2,64	47,67	3,06	47,55	3,36
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,00	0,00	8,42	0,27	11,19	0,91	18,12	1,81	27,33	1,37	34,87	1,41	39,38	1,74	39,50	1,46
8. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0,00	0,00	10,95	0,85	19,29	1,62	28,72	1,91	37,78	3,24	44,64	2,69	48,10	2,31	48,85	2,02
9. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 4133	0,00	0,00	8,98	0,65	11,57	1,55	19,06	1,93	28,78	2,01	36,18	2,03	40,56	1,83	40,61	1,70
10. <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	0,00	0,00	11,13	1,09	18,52	1,30	28,03	1,93	36,73	1,66	43,94	1,80	48,76	1,99	49,25	1,99
11. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,00	0,00	10,41	1,06	17,44	1,71	26,78	1,15	35,96	1,48	43,15	2,66	47,38	2,77	47,10	2,31
12. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1607	0,00	0,00	11,81	1,64	20,39	2,14	28,74	2,23	37,16	2,20	43,47	2,12	47,80	2,47	47,71	2,08
13. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1604	0,00	0,00	9,43	0,81	14,01	1,02	23,17	1,77	33,11	2,31	40,56	2,66	44,36	1,99	44,90	2,59
14. Mistura (1...13)	0,00	0,00	10,00	0,33	17,27	0,98	26,91	1,03	37,88	1,19	43,59	0,65	48,07*	1,16	47,01	2,62

Na Tabela 3 estão dispostos os resultados das análises de variância, comparando os microorganismos em todas as concentrações, utilizando-se o método PLA.

Tabela 3. Análise de variância (método PLA)

	SQ	GL	QM	SQ	GL	QM		
Concentração	Efeito	Efeito	Efeito	Erro	Erro	Erro	F	P
0,031%	2.167,162	13	166,7048	147,5784	126	1,171257	142,3298	<0,00001
0,062%	3.153,436	13	242,572	295,8863	126	2,348304	103,2967	<0,00001
0,125%	5.923,445	13	455,6496	492,8773	126	3,911724	116,4831	<0,00001
0,250%	7.222,961	13	555,6124	549,5962	126	4,361874	127,3793	<0,00001
0,500%	6.204,941	13	477,3032	705,9549	126	5,602816	85,18987	<0,00001
1%	5.188,606	13	399,1235	601,316	126	4,772349	83,63251	<0,00001
2%	4.413,769	13	339,5207	625,3639	125	5,002911	67,86462	<0,00001
4%	4.717,519	13	362,8861	727,1737	126	5,77122	62,87858	<0,00001

Analisados os resultados da Tabela 3, pode-se comprovar diferença significativa entre os microorganismos em todas as concentrações. Na aplicação do teste de Tukey para identificação dessas diferenças (assinaladas em vermelho na Tabela 2), constatou-se:

- A *Candida albicans* comporta-se de forma diferente. Este microorganismo apresenta em todas as concentrações diâmetro do halo de inibição muito maior que os demais microorganismos ($p=0,000023$);
- Os demais microorganismos, por sua vez, comportam-se todos de maneira muito semelhante ($p>0,05$).

5.2 Comparação entre os resultados obtidos pelo método PCA

A Tabela 4 apresenta um quadro-resumo de diâmetros para todas as concentrações de hipoclorito de sódio e para os 13 tipos de microorganismos e sua mistura, obtidos pelo método PCA. As cepas-padrões foram ensaiadas em 10 replicatas. A coluna M apresenta as médias e a coluna DP os desvios-padrão.

Tabela 4. Resumo dos diâmetros (mm) de inibição de crescimento bacteriano dos halos obtidos pelo método PCA para todas as concentrações de hipoclorito de sódio

Concentração	0,031%		0,062%		0,125%		0,250%		0,500%		1,00%		2,00%		4,00%	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	0	0	8,96	0,63	10,26	0,73	15,43	1,53	20,64	1,49	25,24	1,40	34,32	3,42	45,47	1,42
2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	0	0	0,00	0,00	11,71	0,53	14,09	0,80	19,47	1,75	23,94	1,11	27,57	1,40	37,95	1,04
3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	0	10,50	0,86	17,19	1,95	23,39	1,33	31,82	2,06	39,71	4,35	48,21	2,98	65,51	3,15
4. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	9,43	0,37	12,74	1,00	14,79	1,25	21,22	1,66	26,56	1,58	35,51	2,26	44,51	0,86
5. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0,00	0,00	9,59	0,53	13,22	1,26	17,81	1,32	22,68	1,35	29,84	1,88	37,53	3,26
6. <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	0	0	0,00	0,00	11,29	1,15	15,35	1,60	21,46	2,03	27,57	2,65	34,64	3,55	46,25	2,82
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	8,49	0,49	11,24	1,03	14,18	1,19	19,52	1,54	24,22	1,42	30,59	2,63	46,30	3,40
8. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0	0	0,00	0,00	8,92	0,78	11,22	1,09	15,86	0,84	19,70	1,46	26,28	1,42	36,41	1,99
9. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 4133	0	0	0,00	0,00	8,86	0,63	11,03	1,14	17,11	1,38	22,67	1,46	29,43	1,51	40,62	2,86
10. <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	0	0	0,00	0,00	9,71	0,68	12,42	0,73	17,48	1,23	22,37	1,45	28,92	2,03	37,56	2,07
11. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	0,00	0,00	9,61	0,60	12,78	0,87	17,93	0,85	23,02	1,44	31,53	1,74	43,02	2,58
12. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1607	0	0	8,82	0,21	12,09	0,85	15,16	1,37	19,03	1,02	24,77	1,70	33,15	2,35	42,29	1,59
13. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1604	0	0	0,00	0,00	9,96	0,66	13,41	0,98	19,04	0,82	23,66	0,74	31,31	1,99	39,54	3,63
14. Mistura (1...13)	0	0	0,00	0,00	9,40	0,78	12,45	0,82	17,25	0,44	22,06	1,02	27,62	1,40	39,16	1,03

Na Tabela 5 estão os resultados das análises de variância comparando os microorganismos em todas as concentrações, utilizando-se o método PCA.

Tabela 5. Análise de variância (método PCA)

	SQ	gl	QM	SQ	GL	QM		
Concentração	Efeito	Efeito	Efeito	Erro	Erro	Erro	F	P
0,031%	0	13	0	0	126	0	--	--
0,062%	2.769,317	13	213,0243688	13,99558	126	0,111076032	1917,824804	<0,00001
0,125%	616,7399	13	47,44152885	106,71855	126	0,846972619	56,01306085	<0,00001
0,250%	1.172,517	13	90,19360071	172,49297	126	1,368991825	65,88322811	<0,00001
0,500%	1.932,468	13	148,6513688	245,14303	126	1,945579603	76,40467067	<0,00001
1%	2.871,595	13	220,8918888	436,00742	126	3,460376349	63,83464297	<0,00001
2%	3.835,095	13	295,0073268	661,82318	126	5,252564921	56,16443229	<0,00001
%	6.979,316	13	536,8704721	753,59562	126	5,980917619	89,76389683	<0,00001

Analisados os resultados da Tabela 5, pode-se comprovar diferença significativa entre os microorganismos em todas as concentrações, exceto na concentração 0,031%. Na aplicação do teste de Tukey para identificação dessas diferenças (assinaladas em vermelho na tabela 4), constatou-se:

- Na concentração 0,062% verifica-se a existência de dois grupos de microorganismos, segundo o seu comportamento diante do hipoclorito de sódio. Os grupos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Agrupamento de microorganismos de acordo com seu comportamento diante do NaClO.

Grupo 1	Grupo 2
1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659
3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
4. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	6. <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
12. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1607	9. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 4133
	10. <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022
	11. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	13. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1604
	14. Mistura (1...13)

- Os microorganismos do grupo 1 são significativamente mais sensíveis, ou seja, em concentrações menores já apresentam resposta ao hipoclorito de sódio;
- Nas demais concentrações, a *Candida albicans* comporta-se de forma diferente dos demais: em todas as concentrações, apresenta diâmetro do halo de inibição muito maior que os demais microorganismos ($p=0,000023$);
- Os demais microorganismos, por sua vez, comportam-se todos de maneira muito semelhante a partir da concentração 0,125% ($p>0,05$).

5.3 Análise dos resultados obtidos pelo método PCA com o uso do biocida hipoclorito de sódio combinado com ácido acético

Na Tabela 7, segue um quadro-resumo de diâmetros dos halos de inibição, para todas as concentrações de hipoclorito de sódio combinado com ácido acético e para os 13 tipos de microorganismos e sua mistura, obtidos pelo método PCA. Para todas as cepas, o número de amostras (N) é 10. A coluna M apresenta as médias e a coluna DP os desvios-padrão.

Tabela 7. Resumo dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos pelo método PCA para todas as concentrações de ácido acético combinado com hipoclorito de sódio

Concentração	0,1% - 0,125%		0,2% - 0,25%		0,4% - 0,5%		0,8% - 1%	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	13,44	0,98	17,81	0,63	24,24	1,42	30,16	2,21
2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	12,80	0,65	14,98	0,61	19,73	1,67	24,95	1,22
3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	34,05	1,45	40,82	1,39	53,85	1,49	58,31	1,94
4. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13,89	0,37	19,81	1,55	27,45	1,64	39,18	2,75
5. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,87	1,32	18,45	1,82	23,26	1,02	32,92	2,36
6. <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	14,84	0,74	20,87	1,44	26,71	1,17	33,09	1,96
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12,07	0,62	14,96	1,08	20,92	1,53	25,64	0,99
8. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	12,53	0,70	14,74	0,95	18,34	0,97	26,38	1,92
9. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 4133	12,30	0,62	16,99	0,64	21,66	1,54	24,94	1,30
10. <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	13,00	0,55	18,40	0,64	24,66	3,23	29,83	3,04
11. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14,63	1,46	20,42	1,74	30,63	2,01	39,69	1,80
12. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1607	15,62	0,47	19,61	1,92	29,17	1,76	33,95	1,46
13. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1604	14,50	0,74	18,38	0,84	23,36	1,08	28,48	1,47
14. Mistura (1...13)	12,35	0,60	15,65	0,63	17,51	0,42	22,50	1,29

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados das análises de variância comparando os microorganismos em todas as concentrações.

Tabela 8. Análise de variância (hipoclorito de sódio e ácido acético pelo método PCA)

	SQ	GL	QM	SQ	GL	QM		
Concentração	Efeito	Efeito	Efeito	Erro	Erro	Erro	F	p
0,031%	2.167,162	13	166,7048	147,5784	126	1,171257	142,3298	<0,00001
0,062%	3.153,436	13	242,572	295,8863	126	2,348304	103,2967	<0,00001
0,125%	5.923,445	13	455,6496	492,8773	126	3,911724	116,4831	<0,00001
0,250%	7.222,961	13	555,6124	549,5962	126	4,361874	127,3793	<0,00001
0,500%	6.204,941	13	477,3032	705,9549	126	5,602816	85,18987	<0,00001
1%	5.188,606	13	399,1235	601,316	126	4,772349	83,63251	<0,00001
2%	4.413,769	13	339,5207	625,3639	125	5,002911	67,86462	<0,00001
4%	4.717,519	13	362,8861	727,1737	126	5,77122	62,87858	<0,00001

Analisados os resultados da Tabela 7, pode-se comprovar diferença significativa entre os microorganismos em todas as concentrações. Na aplicação do teste de Tukey para identificação dessas diferenças (assinaladas em vermelho na tabela), constatou-se:

- A *Candida albicans* comporta-se de forma diferente. Em todas as concentrações, apresenta diâmetro do halo de inibição muito maior que os demais microorganismos ($p=0,000023$);
- Os demais microorganismos, por sua vez, comportam-se todos de maneira muito semelhante ($p>0,05$).

5.4 Análise para determinar a concentração ideal do biocida pelo método PLA

Na Tabela 9 estão apresentadas as comparações entre as concentrações investigadas para todos os microorganismos, utilizando o método PLA e hipoclorito de sódio.

Tabela 9. Comparações entre as concentrações (PLA)1. *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	8,95	15,119	24,774	34,484	43,244	48,011	48,584
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,50277	1,586488	1,799983	2,038617	2,951595	3,272676	3,487642

2. *Bacillus subtilis* ATCC 19659

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	9,53	18,448	27,6	38,467	45,6	48,406	49,169
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,423031	1,422727	1,152389	1,516385	0,557614	0,800086	0,843557

3. *Candida albicans* ATCC 10231

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	15,277	28,015	39,621	50,461	57,615	62,673	65,175	65,954
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	4,049395154	4,759758	4,869464	4,593891	4,519101	3,058769	2,575885	3,303443

4. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	10,534	17,403	25,243	34,142	40,753	45,803	45,333
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	1,258025	2,069262	2,363359	2,761512	1,837511	2,433489	2,713542

5. *Escherichia coli* ATCC 25922

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	9,657	16,264	26,741	35,819	43,04	47,497	47,379
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,844973	1,568816	1,705947	1,728098	1,566567	1,372217	1,447423

6. *Proteus mirabilis* ATCC 25933

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	9,997	17,27	26,914	37,884	43,59	48,066	47,011
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,33096	0,981541	1,026853	1,187389	0,646684	1,161906	2,616522

7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	9,302	16,974	28,017	37,728	44,395	47,669	47,549
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,706066	1,650301	1,425787	2,829565	2,64136	3,061719	3,358334

continua

5. Resultados

continuação da Tabela 9.

8. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	8,421	11,192	18,121	27,328	34,87	39,377	39,497
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,270943	0,912808	1,809545	1,365282	1,414253	1,740505	1,458569

9. *Serratia marcescens* ATCC 4133

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	10,949	19,285	28,721	37,779	44,642	48,096	48,847
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,850914	1,616919	1,914706	3,240687	2,68765	2,314559	2,016278

10. *Shigella flexneri* ATCC 12022

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	8,975	11,566	19,056	28,784	36,182	40,561	40,607
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,648798	1,549568	1,926535	2,008206	2,025711	1,830182	1,699791

11. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	11,13	18,523	28,026	36,726	43,935	48,762	49,247
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	1,088301	1,304173	1,928835	1,660563	1,801489	1,985737	1,987439

12. *Staphylococcus aureus* IAL 1607

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	10,411	17,44	26,778	35,958	43,152	47,376	47,101
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	1,061879	1,710861	1,153447	1,482174	2,655894	2,768261	2,314526

13. *Staphylococcus aureus* IAL 1604

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	11,811	20,388	28,736	37,155	43,467	47,796	47,705
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	1,643286	2,136705	2,229779	2,204764	2,123404	2,4681	2,079141

14. Mistura (1...13)

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	9,427	14,013	23,166	33,112	40,558	44,36444	44,904
N	10	10	10	10	10	10	9	10
D.P.	0	0,808566	1,019412	1,771046	2,30628	2,659577	1,994524	2,591195

Analisando-se a Tabela 9 apresentada, pode-se comprovar que:

- Para todos os microorganismos, existe inibição significativa do crescimento a partir da concentração de 0,062% ($p=0,000123$). Esta pode ser considerada, portanto, a concentração mínima para inibir o crescimento bacteriano;
- Para a *Candida albicans*, nas concentrações acima de 0,5%, não existe efeito significativo, ou seja, o halo de inibição não aumenta significativamente;
- Para os demais microorganismos, nas concentrações acima de 2%, não existe efeito significativo, ou seja, o halo de inibição não aumenta significativamente.

5.5 Análise para determinar a concentração ideal do biocida pelo método PCA

Na Tabela 10 estão apresentadas as comparações entre as concentrações investigadas para todos os microorganismos, utilizando o método PCA e hipoclorito de sódio.

Tabela 10. Comparações entre as concentrações de hipoclorito de sódio pelo método PCA1. *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	8,961	10,259	15,434	20,644	25,244	34,318	45,469
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,632815	0,731398	1,531645	1,492285	1,398008	3,417845	1,417827

2. *Bacillus subtilis* ATCC 19659

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	11,707	14,088	19,467	23,943	27,566	37,946
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,53041	0,800622	1,74975	1,10757	1,395048	1,042488

3. *Candida albicans* ATCC 10231

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	10,5	17,188	23,386	31,818	39,71	48,207	65,508
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,856024	1,949911	1,326861	2,057343	4,352537	2,984363	3,151799

4. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	9,429	12,735	14,785	21,215	26,562	35,514	44,51
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,36501	1,000169	1,250451	1,656504	1,577261	2,260655	0,863571

5. *Escherichia coli* ATCC 25922

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	9,585	13,218	17,812	22,682	29,843	37,529
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,53313	1,2572	1,322017	1,346558	1,8787	3,260336

6. *Proteus mirabilis* ATCC 25933

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	11,288	15,347	21,461	27,567	34,636	46,253
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	1,147372	1,600014	2,026971	2,654037	3,546583	2,824945

7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	8,494	11,243	14,182	19,522	24,221	30,592	46,304
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,493563	1,028278	1,187348	1,53841	1,422005	2,630259	3,395645

continua

5. Resultados

continuação da Tabela 10.

8. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	8,916	11,22	15,859	19,696	26,283	36,408
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,776376	1,09135	0,83717	1,464045	1,415769	1,991357996

9. *Serratia marcescens* ATCC 4133

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	8,863	11,033	17,106	22,674	29,427	40,615
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,629569	1,141413	1,379776	1,462313	1,506969	2,858003

10. *Shigella flexneri* ATCC 12022

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	9,711	12,42	17,476	22,373	28,924	37,558
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,676272	0,733924	1,229609	1,446744	2,033225	2,068444

11. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	9,608	12,78	17,927	23,023	31,532	43,023
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,599255	0,87271	0,85457	1,444892	1,738964	2,576423

12. *Staphylococcus aureus* IAL 1607

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	8,822	12,094	15,162	19,03	24,765	33,145	42,285
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0,212122	0,849316	1,368176	1,015404	1,700688	2,350542	1,586521

13. *Staphylococcus aureus* IAL 1604

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	9,964	13,409	19,039	23,664	31,311	39,542
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,656475	0,983807	0,823049	0,743359	1,987564	3,632804

14. Mistura (1...13)

Concentração	0,031%	0,062%	0,125%	0,250%	0,500%	1,00%	2,00%	4,00%
Médias	0	0	9,404	12,449	17,249	22,062	27,622	39,16
N	10	10	10	10	10	10	10	10
D.P.	0	0	0,782903	0,818813	0,441071	1,022294	1,398664	1,025335

Analisando-se a tabela 10 apresentada, pode-se comprovar:

- Para alguns microorganismos, existe inibição significativa do crescimento a partir da concentração de 0,062% ($p=0,000123$); outros microorganismos, contudo, só apresentam inibição significativa a partir da concentração de 0,125% ($p=0,000123$). Esta última pode ser considerada, portanto, a concentração mínima para inibitória.

5.6 Análise para determinar pelo método PCA a concentração ideal do biocida hipoclorito de sódio combinado com ácido acético

Na Tabela 11 estão apresentadas as comparações entre as concentrações investigadas para todos os microorganismos, utilizando o método PCA e hipoclorito de sódio combinado com ácido acético.

Tabela 11. Comparações entre as concentrações pelo método PCA utilizando hipoclorito de sódio combinado com ácido acético1. *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	13,442	17,813	24,244	30,164
N	10	10	10	10
D.P.	0,97738654	0,62774818	1,41665647	2,206214

2. *Bacillus subtilis* ATCC 19659

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	12,801	14,979	19,731	24,945
N	10	10	10	10
D.P.	0,65267739	0,61228987	1,66975347	1,223059

3. *Candida albicans* ATCC 10231

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	34,046	40,819	53,853	58,314
N	10	10	10	10
D.P.	1,45332722	1,38759144	1,48654745	1,937491

4. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	13,891	19,809	27,451	39,18
N	10	10	10	10
D.P.	0,37331696	1,54827826	1,63608238	2,749129

5. *Escherichia coli* ATCC 25922

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	14,873	18,448	23,257	32,919
N	10	10	10	10
D.P.	1,31936896	1,81878959	1,01797239	2,356954

6. *Proteus mirabilis* ATCC 25933

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	14,844	20,873	26,714	33,093
N	10	10	10	10
D.P.	0,74220692	1,43759869	1,17186651	1,962125

7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	12,065	14,961	20,924	25,644
N	10	10	10	10
D.P.	0,6207925	1,07760485	1,52961288	0,992474

continua

5. Resultados

continuação da Tabela 11.

8. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	12,528	14,737	18,342	26,381
N	10	10	10	10
D.P.	0,69644813	0,95287926	0,97386743	1,923633

9. *Serratia marcescens* ATCC 4133

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	12,298	16,987	21,66	24,941
N	10	10	10	10
D.P.	0,61733837	0,63767024	1,54205491	1,303648

10. *Shigella flexneri* ATCC 12022

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	12,996	18,397	24,656	29,827
N	10	10	10	10
D.P.	0,55134583	0,63908007	3,22657782	3,042035

11. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	14,63	20,416	30,634	39,685
N	10	10	10	10
D.P.	1,46342824	1,74259194	2,01491218	1,798149

12. *Staphylococcus aureus* IAL 1607

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	15,619	19,609	29,171	33,946
N	10	10	10	10
D.P.	0,46971504	1,91766322	1,76318178	1,4579

13. *Staphylococcus aureus* IAL 1604

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	14,5	18,384	23,362	28,481
N	10	10	10	10
D.P.	0,73742796	0,83763158	1,08256691	1,472605

14. Mistura (1...13)

Concentração	0,1% - 0,125%	0,2% - 0,250%	0,4% - 0,50%	0,8% - 1%
Médias	12,354	15,649	17,506	22,5
N	10	10	10	10
D.P.	0,59902142	0,630528	0,416632	1,29071

Analisando-se a Tabela 11 apresentada, pode-se comprovar que:

- Para todos os microorganismos existe inibição significativa do crescimento a partir da concentração de 0,2% de ácido acético e 0,25% de hipoclorito de sódio ($p=0,000159$). Estas últimas podem ser consideradas, portanto, as concentrações mínimas inibitórias.

5.7 Comparação entre os métodos de inibição do crescimento bacteriano (PLA e PCA com NaClO e PCA com biocida combinado)

A Tabela 12 apresenta a comparação entre os 3 métodos, em relação a todas as bactérias e concentrações.

Tabela 12. Comparações entre as concentrações (3 métodos)

BACTÉRIAS	MÉTODOS	CONCENTRAÇÕES															
		0,1% AA - 0,125% HS				0,2% AA - 0,250% HS				0,4% AA - 0,500% HS				0,8% AA - 1% HS			
		Médias	N	D.P.	p	Médias	N	D.P.	P	Médias	N	D.P.	p	Médias	N	D.P.	p
1. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	PCA-AA-HS	13,44	10	0,98	2,19202E-09	17,81	10	0,63	4,42242E-14	24,24	10	1,42	1,81306E-16	30,16	10	2,21	6,19711E-16
	PCA-HS	10,26	10	0,73		15,43	10	1,53		20,64	10	1,49		25,24	10	1,40	
	PLA-HS	15,12	10	1,59		24,77	10	1,80		34,48	10	2,04		43,24	10	2,95	
2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	PCA-AA-HS	12,80	10	0,65	4,03422E-15	14,98	10	0,61	3,0879E-24	19,73	10	1,67	2,72667E-21	24,95	10	1,22	2,60562E-28
	PCA-HS	11,71	10	0,53		14,09	10	0,80		19,47	10	1,75		23,94	10	1,11	
	PLA-HS	18,45	10	1,42		27,60	10	1,15		38,47	10	1,52		45,60	10	0,56	
3. <i>Cândida albicans</i> ATCC 10231	PCA-AA-HS	34,05	10	1,45	6,58391E-15	40,82	10	1,39	1,23732E-17	53,85	10	1,49	2,32813E-17	58,31	10	1,94	5,99254E-15
	PCA-HS	17,19	10	1,95		23,39	10	1,33		31,82	10	2,06		39,71	10	4,35	
	PLA-HS	39,62	10	4,87		50,46	10	4,59		57,62	10	4,52		62,67	10	3,06	
4. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	PCA-AA-HS	13,89	10	0,37	6,11503E-08	19,81	10	1,55	1,95278E-12	27,45	10	1,64	5,27145E-13	39,18	10	2,75	8,5347E-15
	PCA-HS	12,74	10	1,00		14,79	10	1,25		21,22	10	1,66		26,56	10	1,58	
	PLA-HS	17,40	10	2,07		25,24	10	2,36		34,14	10	2,76		40,75	10	1,84	
5. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	PCA-AA-HS	14,87	10	1,32	2,92342E-12	18,45	10	1,82	2,652E-16	23,26	10	1,02	2,24909E-21	32,92	10	2,36	1,82132E-19
	PCA-HS	9,59	10	0,53		13,22	10	1,26		17,81	10	1,32		22,68	10	1,35	
	PLA-HS	16,26	10	1,57		26,74	10	1,71		35,82	10	1,73		43,04	10	1,57	
6. <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	PCA-AA-HS	14,84	10	0,74	5,37998E-13	20,87	10	1,44	3,08113E-16	26,71	10	1,17	2,78702E-19	33,09	10	1,96	3,32421E-16
	PCA-HS	11,29	10	1,15		15,35	10	1,60		21,46	10	2,03		27,57	10	2,65	
	PLA-HS	17,27	10	0,98		26,91	10	1,03		37,88	10	1,19		43,59	10	0,65	
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	PCA-AA-HS	12,07	10	0,62	2,38114E-11	14,96	10	1,08	1,06583E-20	20,92	10	1,53	5,69187E-18	25,64	10	0,99	1,63697E-20
	PCA-HS	11,24	10	1,03		14,18	10	1,19		19,52	10	1,54		24,22	10	1,42	
	PLA-HS	16,97	10	1,65		28,02	10	1,43		37,73	10	2,83		44,40	10	2,64	
8. <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	PCA-AA-HS	12,53	10	0,70	5,40204E-10	14,74	10	0,95	3,70971E-11	18,34	10	0,97	2,2909E-19	26,38	10	1,92	1,81036E-17
	PCA-HS	8,92	10	0,78		11,22	10	1,09		15,86	10	0,84		19,70	10	1,46	
	PLA-HS	11,19	10	0,91		18,12	10	1,81		27,33	10	1,37		34,87	10	1,41	
9. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 4133	PCA-AA-HS	12,30	10	0,62	3,89724E-18	16,99	10	0,64	1,7457E-21	21,66	10	1,54	6,59195E-18	24,94	10	1,30	9,89327E-21
	PCA-HS	8,86	10	0,63		11,03	10	1,14		17,11	10	1,38		22,67	10	1,46	
	PLA-HS	19,29	10	1,62		28,72	10	1,91		37,78	10	3,24		44,64	10	2,69	
10. <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	PCA-AA-HS	13,00	10	0,55	5,5584E-07	18,40	10	0,64	1,92593E-12	24,66	10	3,23	8,73078E-11	29,83	10	3,04	8,00848E-13
	PCA-HS	9,71	10	0,68		12,42	10	0,73		17,48	10	1,23		22,37	10	1,45	
	PLA-HS	11,57	10	1,55		19,06	10	1,93		28,78	10	2,01		36,18	10	2,03	
11. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PCA-AA-HS	14,63	10	1,46	4,44131E-15	20,42	10	1,74	9,93248E-18	30,63	10	2,01	2,78809E-20	39,69	10	1,80	3,59068E-21
	PCA-HS	9,61	10	0,60		12,78	10	0,87		17,93	10	0,85		23,02	10	1,44	
	PLA-HS	18,52	10	1,30		28,03	10	1,93		36,73	10	1,66		43,94	10	1,80	
12. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1607	PCA-AA-HS	15,62	10	0,47	8,57851E-10	19,61	10	1,92	1,36105E-14	29,17	10	1,76	6,80939E-19	33,95	10	1,46	1,86595E-16
	PCA-HS	12,09	10	0,85		15,16	10	1,37		19,03	10	1,02		24,77	10	1,70	
	PLA-HS	17,44	10	1,71		26,78	10	1,15		35,96	10	1,48		43,15	10	2,66	
13. <i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1604	PCA-AA-HS	14,50	10	0,74	2,83185E-15	18,38	10	0,84	1,05638E-18	23,36	10	1,08	8,58912E-21	28,48	10	1,47	2,30514E-21
	PCA-HS	9,96	10	0,66		13,41	10	0,98		19,04	10	0,82		23,66	10	0,74	
	PLA-HS	20,39	10	2,14		28,74	10	2,23		37,16	10	2,20		43,47	10	2,12	
14. Mistura (1...13)	PCA-AA-HS	12,35	10	0,60	3,73845E-12	15,65	10	0,63	2,45565E-17	17,51	10	0,42	2,85275E-21	22,50	10	1,29	6,76817E-20
	PCA-HS	9,40	10	0,78		12,45	10	0,82		17,25	10	0,44		22,06	10	1,02	
	PLA-HS	14,01	10	1,02		23,17	10	1,77		33,11	10	2,31		40,56	10	2,66	

 Maior Inibição

 2ª Maior inibição

 Menor inibição

Na Tabela 12 são apresentados os resultados das análises de variância. Os três métodos foram comparados para cada bactéria e para cada concentração, perfazendo, assim, 56 análises que estão resumidas na Tabela 11. Os resultados são comentados a seguir:

As cepas-padrões relacionadas no grupo 1 da Tabela 13 apresentam padrões de resultados semelhantes. Em todas as concentrações ocorreu o mesmo comportamento. O método PLA (Tabela 12, Figuras 22 a 29) apresenta resultados de diâmetro do halo de inibição sempre maiores que os dos demais métodos. Por sua vez, o método PCA (com hipoclorito de sódio e ácido acético) apresenta resultados de diâmetros também maiores que os observados pelo PCA usando apenas com hipoclorito de sódio. As diferenças mais significativas observadas. Neste grupo pelo método PCA estão relacionadas com o maior ou menor diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano. Como exemplo desta observação, destacam-se as diferenças entre as Figuras 22,23 e 24.

Tabela 13. Agrupamento de microorganismos de acordo com seu comportamento diante do NaClO e do NaClO combinado com CH₃COOH

Grupo 1	Grupo 2
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Mistura das 13 cepas padrão
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 4133	
<i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1607	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
<i>Staphylococcus aureus</i> IAL 1604	

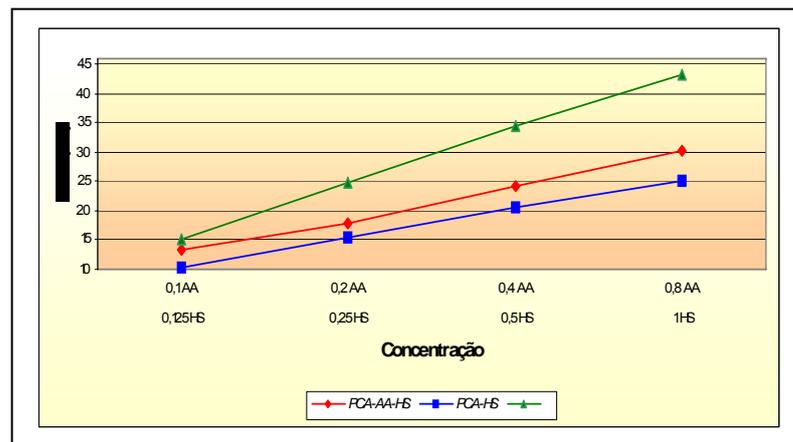


Figura 22. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Acinetobacter calcoaceticus*)

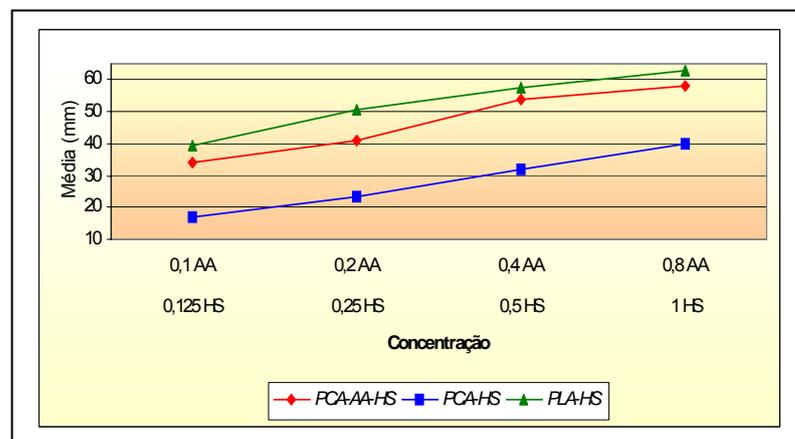


Figura 23. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Candida albicans*)

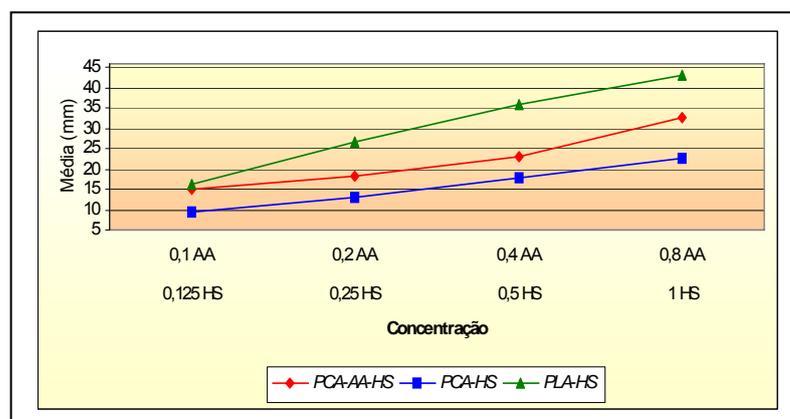


Figura 24. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS: PCA (CH₃COOH+NaClO), PCA-HS: PCA(NaClO), PLA-HS: PLA(NaClO) (*Escherichia coli*)

As cepas-padrões relacionadas no grupo 2 da Tabela 13 apresentam padrões de resultados diferentes. Para o *Bacillus subtilis* (Figura 25) o método PLA em todas as concentrações apresenta diâmetros maiores que os demais métodos. Por sua vez, o método PCA com hipoclorito de sódio e ácido acético, não difere do método PCA apenas com o hipoclorito de sódio (Figura 25). O mesmo padrão de resultado foi observado com a cepa de *Enterococcus faecalis*, a não ser para a concentração 0,8% de ácido acético e 1% de hipoclorito de sódio (figura 26) nas quais os resultados não diferem dos do método PCA com hipoclorito de sódio. Para a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu o mesmo comportamento em todas as concentrações. O método PLA apresenta diâmetros sempre maiores que os demais. Por sua vez, a relação entre os 2 métodos PCA é muito estreita (Figura 27). Para a cepa de *Shigella flexneri* o método PLA apresenta os maiores diâmetros em todas as concentrações, exceto na concentração de 0,125% de NaClO onde apresenta os piores resultados. O método com a solução combinada é superior ao com NaClO. Para a mistura das 13 cepas de microorganismos, o método PLA apresenta

diâmetro do halo de inibição sempre maiores que os demais. Por sua vez, nas concentrações mais baixas o PCA com hipoclorito de sódio e ácido acético apresenta diâmetros maiores que o PCA apenas com hipoclorito de sódio; nas concentrações mais altas (Figura 29), se equivalem.

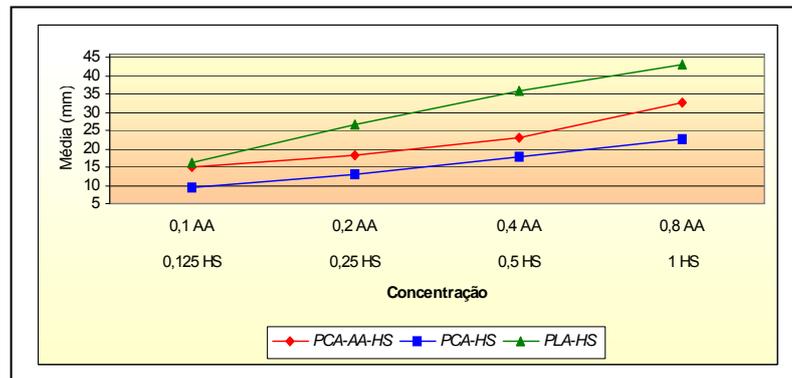


Figura 25. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA (CH₃COOH + NaClO), PCA-HS : PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Bacillus subtilis*).

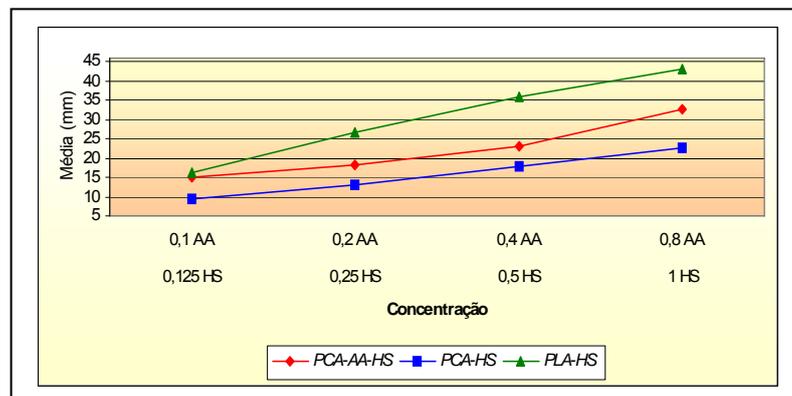


Figura 26. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS : PCA H₃COOH + NaClO), PCA-HS:PCA(NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Enterococcus faecalis*).

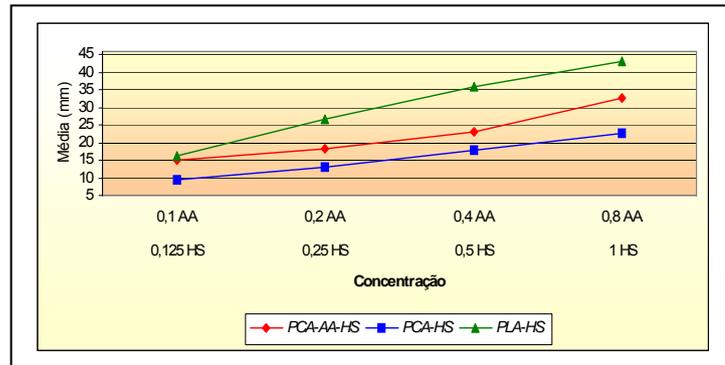


Figura 27. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS: PCA ($\text{CH}_3\text{COOH}+\text{NaClO}$), PCA-HS: PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Pseudomonas aeruginosa*).

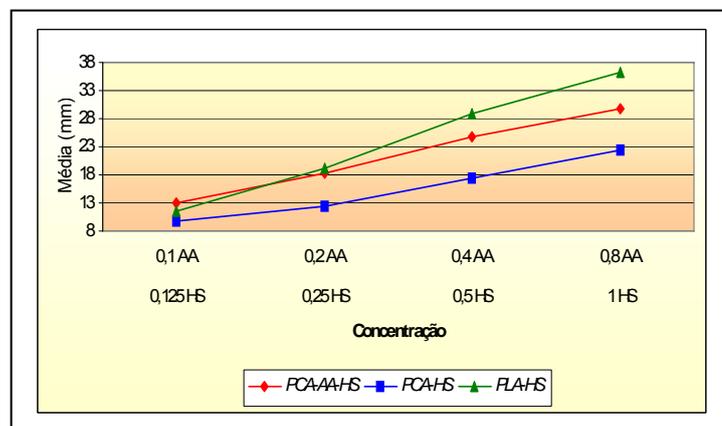


Figura 28. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS: PCA ($\text{CH}_3\text{COOH}+\text{NaClO}$), PCA-HS: PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (*Shigella flexneri*).

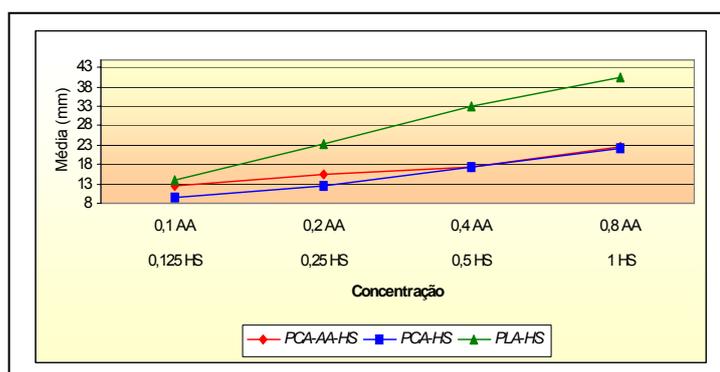


Figura 29. Distribuição das médias dos diâmetros dos halos de inibição das duas soluções biocidas pelos três métodos - PCA-AA-HS: PCA (CH₃COOH+NaClO), PCA-HS: PCA (NaClO) e PLA-HS: PLA (NaClO) (mistura das 13 cepas).

5.8 Atividade bactericida do hipoclorito de sódio com fragmentação de DNA avaliado pela PCR e PCR em tempo real

Quando se avalia a integridade do DNA, após exposição a diferentes concentrações de NaClO seguida da precipitação de DNA e eletroforese em gel, observa-se presença de uma banda fluorescente nas amostras diluídas em solução salina ou em NaClO a 0,03% (Figura 22). Não foi observado material genômico nas amostras a que foi adicionado NaClO a 1%.

Dados semelhantes ao observados em produtos de PCR também foram notados quando da realização da reação de detecção em tempo real pela PCR. As amostras diluídas em solução salina apresentaram evidente detecção de fluorescência. Por outro lado, as amostras diluídas em NaClO a 1% apresentaram apenas discreta emissão fluorescente. Ao avaliar as curvas de dissociação relacionadas aos produtos de reação, naquelas referentes às soluções diluídas em NaClO 1%, observa-se a presença de produtos inespecíficos (Figuras 31 e 32). Estes dados foram confirmados pela análise de eletroforese em gel de Ágarose (Figura 30).

5.9 Quantificação de rRNA bacteriano

Na quantificação de rRNA das soluções bacterianas equivalentes aos tubos da escala de McFarland, foi observada diminuição progressiva dos valores de ciclo de detecção (Ct) a partir das concentrações equivalentes aos tubos 0,5 a 4 da escala. Observa-se a elevação dos Ct quando as concentrações se elevam a valores maiores que os equivalentes ao nível 4 da escala de MacFarland (Tabela14 e Figuras 33 e 34).

Quando se realizou PCR em tempo real com assimetria de concentração de oligonucleotídeos iniciadores, com o intuito de inibir o “efeito gancho”, não foi observada diferença dos valores de Ct quando comparados aos obtidos com a utilização de concentrações semelhantes dos oligonucleotídeos iniciadores.



Figura 30. Fotografia do gel de Ágarose a 5% e brometo de etídio sob emissão de luz UV. (1) Amostra controle contendo solução bacteriana pura. (2) Amostra com solução bacteriana + 0,5% de NaClO a 1%. (3) Amostra com solução bacteriana pura + igual volume de solução fisiológica.

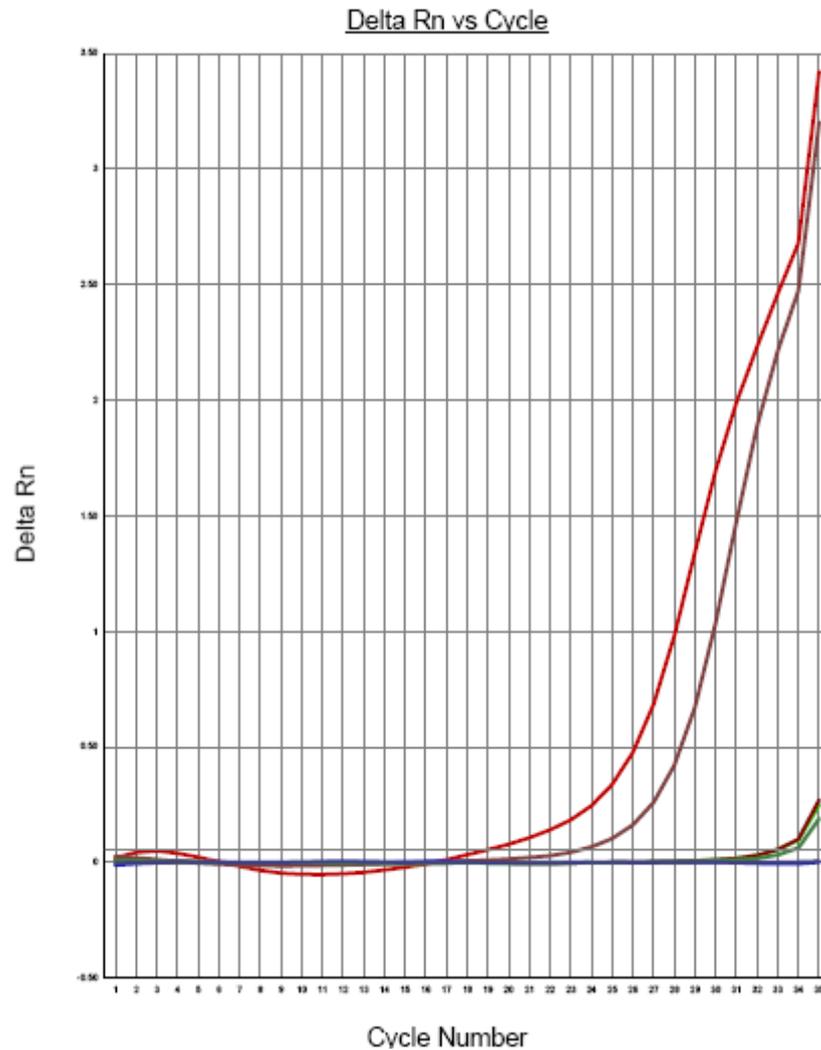


Figura 31. Determinação de intensidade de fluorescência emitida pelas reações de SYBR-Green. As amostras submetidas à solução salina (linhas vermelha e púrpura) apresentam um sinal de detecção a partir dos ciclos 17 e 20. As amostras submetidas ao mesmo volume de solução de NaClO a 1% (linha verde-escuro) e as amostras controle negativo (linhas marrom e verde-claro) apresentam sinal de detecção a partir do ciclo de número 30.

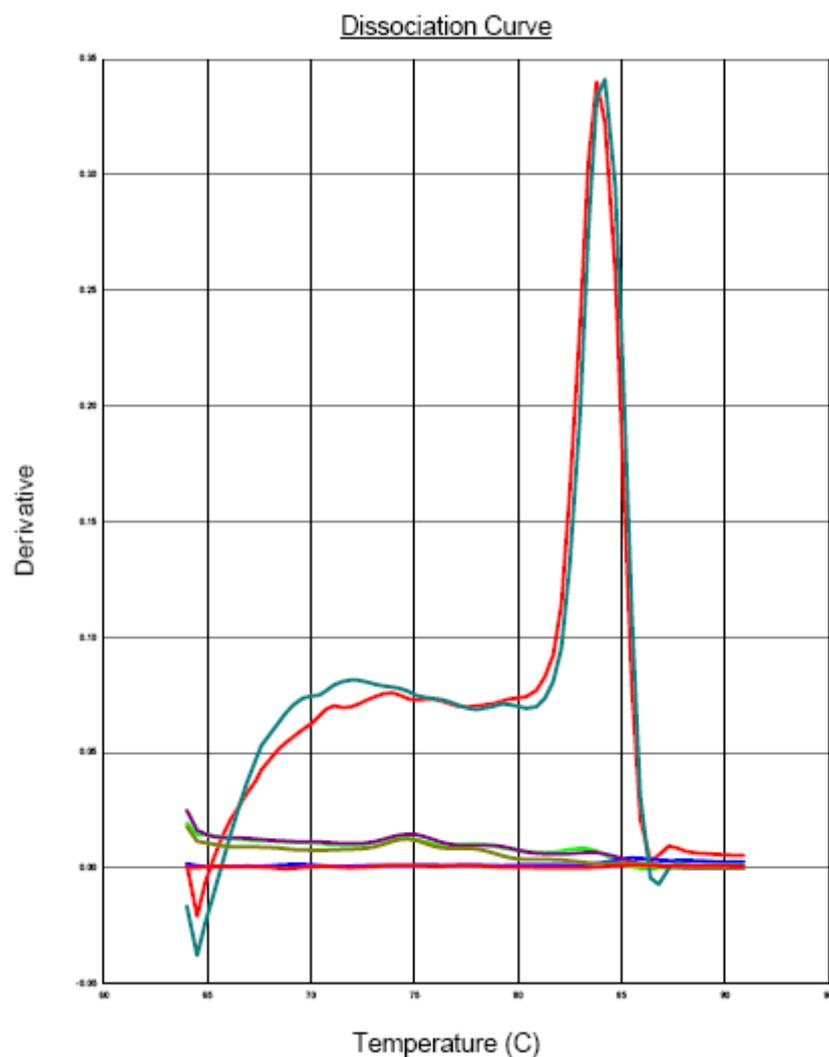


Figura 32. Curva de dissociação dos produtos das reações de SYBR-Green. As amostras submetidas à solução salina (linhas vermelha e azul clara) apresentam um sinal único de dissociação. As reações que contêm as amostras submetidas às soluções de NaClO 1% (linha vermelha – inferior e verde-escuro), NaClO 0,03% (linhas púrpura e verde-claro) e a amostra controle negativo (linha marrom) apresentam sinais inespecíficos de dissociação.

Tabela 14. Valores do ciclo de detecção de sinal de sonda Taqman® de acordo com a concentração de RNA das amostras pela escala de MacFarland

□	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ct	16.3	15.3	15.1	14.6	14.55	14.72	14.9	15.0	14.18	17.35	18.88
							8	1			

□ = Concentração das soluções de acordo com a escala de MacFarland

Ct = Ciclo do *Real-Time* PCR no qual a amostra cruza a linha de detecção.

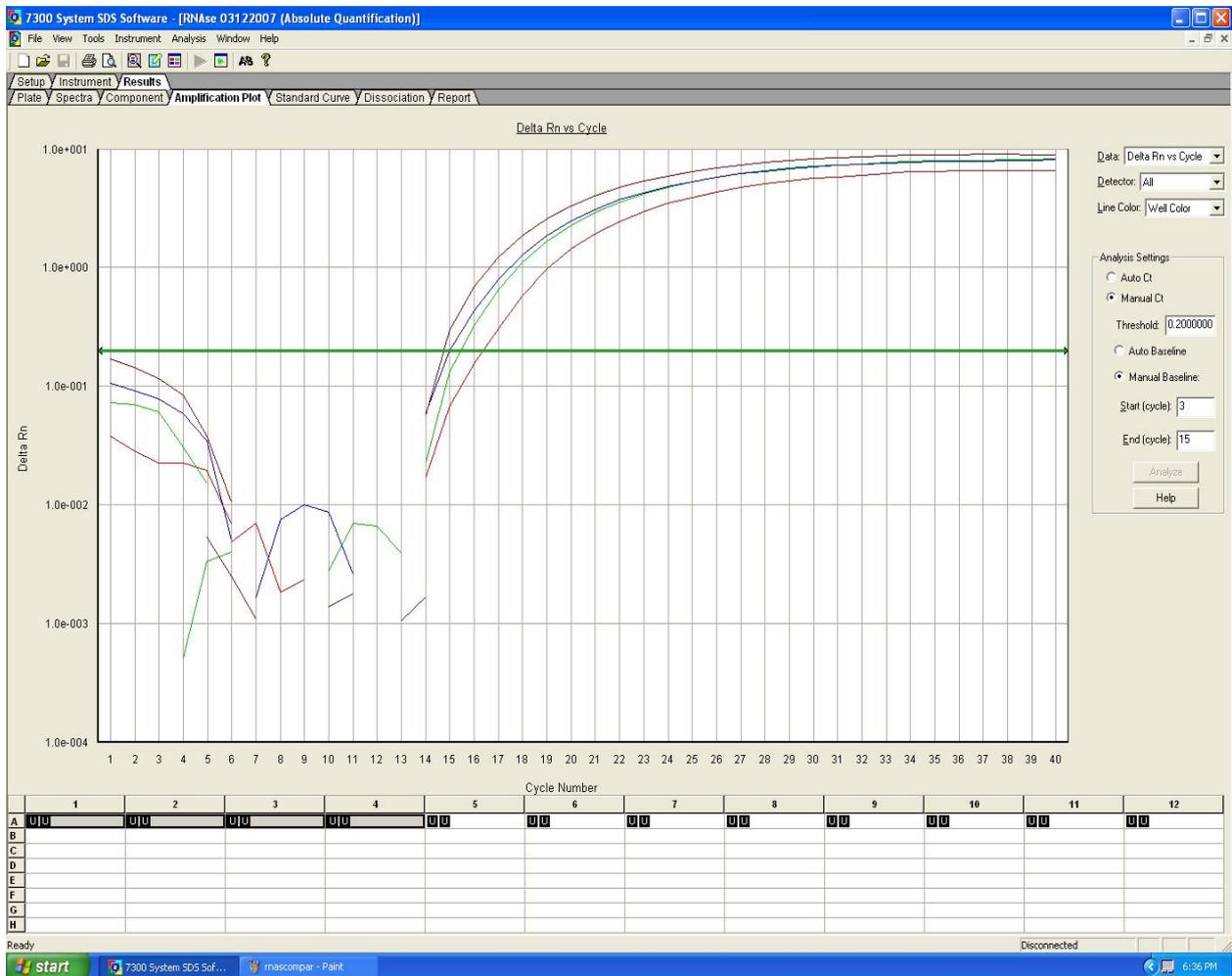


Figura 33. Curva de amplificação das soluções com concentrações de RNA por Taqman® em amostras bacterianas não diluídas equivalentes aos níveis 0,5 a 3 da escala de MacFarland.

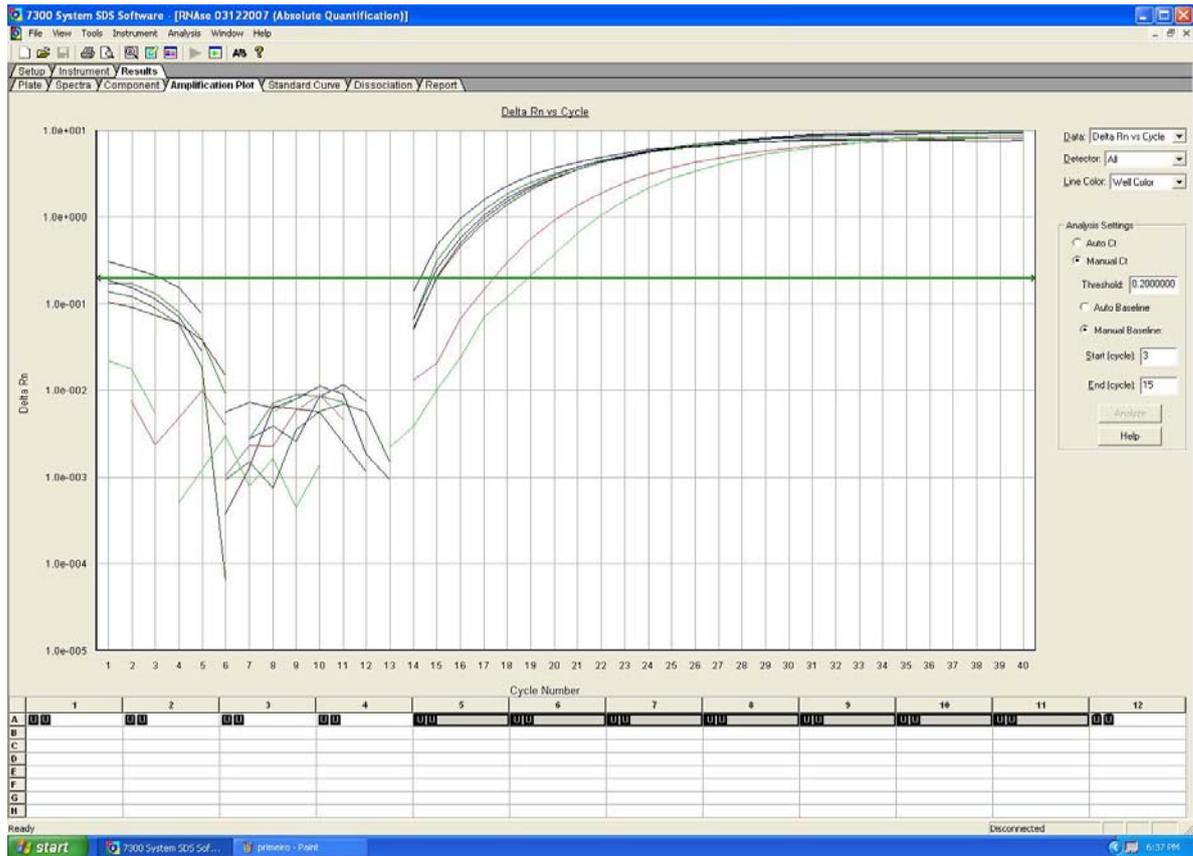


Figura 34. Curva de amplificação das soluções com concentrações de RNA por Taqman® do tubo 4 a 10 da escala MacFarland em amostras bacterianas não diluídas.

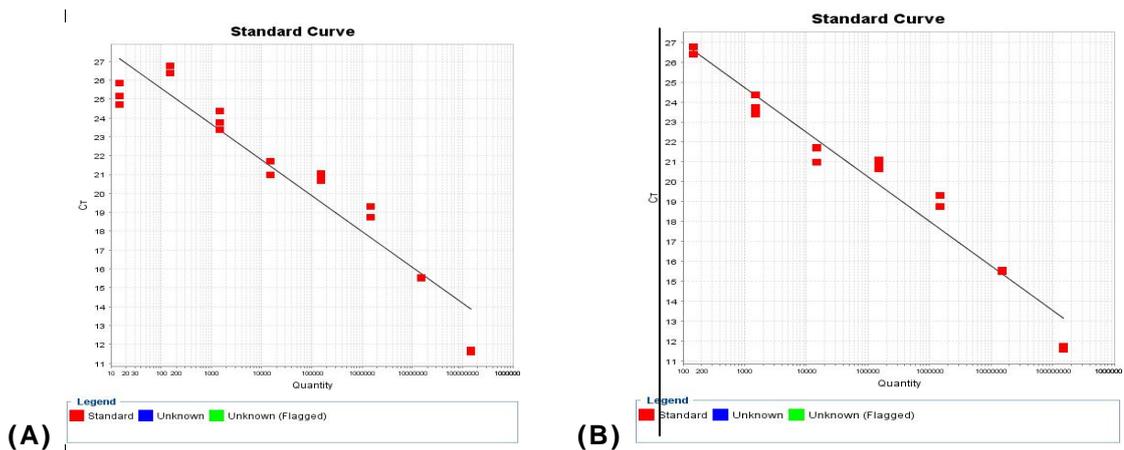


Figura 35. Curva de amplificação de RNA por Taqman® das soluções com concentrações de diluições 1:10 a partir tubo 0,5 da escala McFarland até a concentração final de 15 (A) ou até 150 (B) UFC/mL utilizadas como curva padrão para cálculo de diminuição de carga bacteriana.

Ao observar o limite máximo de proporcionalidade da curva com amostras puras até o tubo 4 da escala de MacFarland, foi realizada uma diluição das amostras em 1:10 para dar seqüência aos estudos . Na avaliação das amostras diluídas a partir do tubo 0,5 da escala de MacFarland para estabelecer a sensibilidade de detecção de carga microbiana por PCR em tempo real, observou-se que o limite de detecção era a concentração de $1,5 \times 10^2$ UFC/mL (Figura 25). Na padronização da curva-padrão, ao utilizar até 15 UFC/mL foi observado um grau de inclinação da curva (*slope*) de -1,6, sendo que ao utiliza-la até 150 UFC/mL, a inclinação da curva é de -2,9. Quando avaliado o grau de inclinação entre as quantificações de $1,5 \times 10^5$ até $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, a eficiência da reação ficou acima de 98% (*slope*=-3,2).

Ao quantificar o rRNA das amostras contendo meio de cultura semi-sólido enriquecido com *E. coli* e submetido ao tratamento com solução fisiológica (controle positivo) ou após biocida em tempos progressivos, foi possível observar (Figura 36) a redução de carga microbiana em $1,07 \times 10^9$ ($\pm 2,5 \times 10^9$), atingindo valores inferiores aos limites de quantificação 15 UFC/mL (Figura 33).

Ao quantificar rRNA após incubação em meio de cultura do material resultante do tratamento com biocida, foi observada redução de carga em $1,4 \times 10^9$ ($\pm 2 \times 10^9$) (Figura 37).

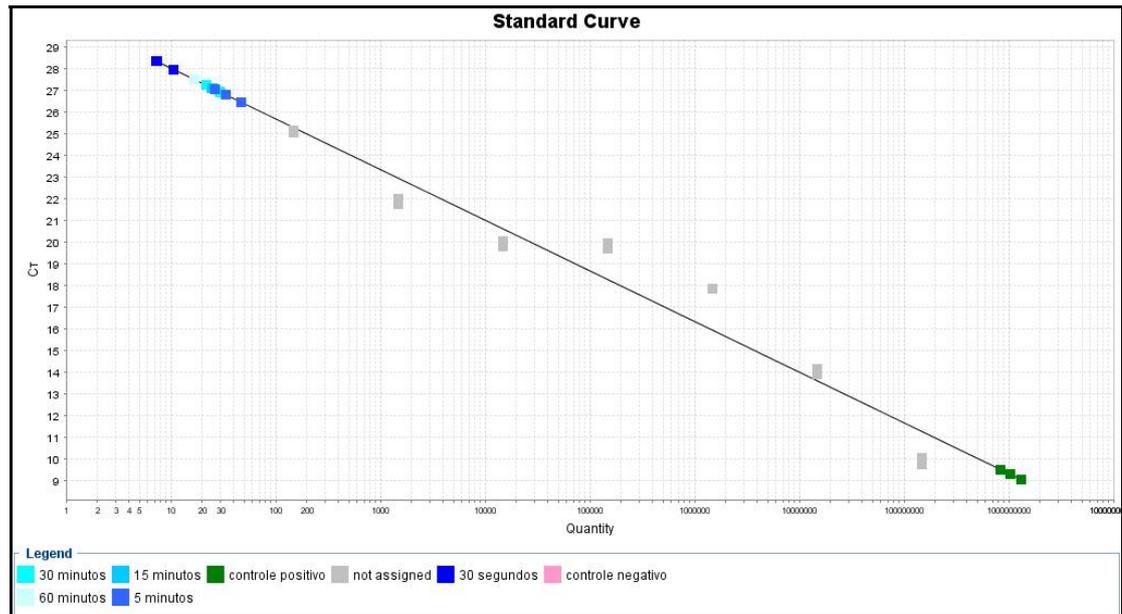


Figura 36. Curva de amplificação de RNA por Taqman® dos meios de cultura contaminados submetidos ao tratamento com solução biocida (NaClO + CH₃COOH) nos tempos 30 segundos, 5, 15, 30 e 60 minutos.

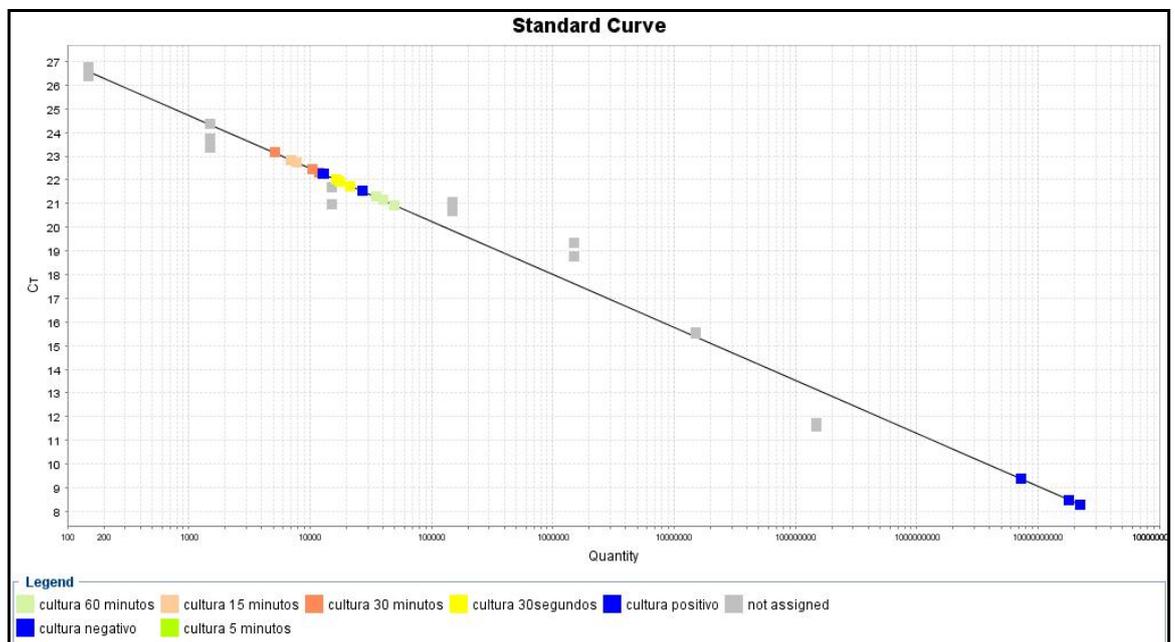


Figura 37. Curva de amplificação de RNA por Taqman® dos meios de cultura contaminados submetidos ao tratamento com solução biocida (NaClO + CH₃COOH) nos tempos 30 segundos, 5, 15, 30 e 60 minutos após incubação em meio de cultura por 24 horas.

5.9.1 Ensaio microbiológico da atividade bactericida do biocida combinado (NaClO e CH₃COOH)

Os resultados do ajuste do pH da solução aquosa de NaClO (pH 11.0) combinada com CH₃COOH, para pH 6,6 e utilizada contra as diversas espécies bacterianas estudadas são mostrados na Tabela 15. A acidificação amplifica a atividade bactericida e já nos primeiros 30 segundos não foram observadas bactérias viáveis no meio de cultura. Houve uma redução da viabilidade bacteriana em 3×10^9 UFC/mL . Estes resultados complementam os estudos de inibição do crescimento bacteriano através do método de difusão com PCA e são informações úteis e seguras para o uso efetivo deste biocida.

Tabela 15. Atividade bactericida da solução combinada de NaClO e CH₃COOH

Microorganismos	Número de células sobreviventes (\log_{10} UFC/mL ⁻¹)			
	Período de contato (min.)			
	0,5	5	10	30
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± .00	< 1.00 ± .00	< 1.00 ± .00
<i>Bacillus subtilis</i> *	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Candida albicans</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Enterococcus faecalis</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Escherichia coli</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Proteus mirabilis</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Serratia marcescens</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Shigella flexneri</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00	< 1.00 ± 0.00

5.9.2 Ensaio microbiológico do efeito da atividade bactericida do biocida combinado (NaClO e CH₃COOH) no SADEMC

Estes ensaios foram realizados para evidenciar a ação do biocida (NaClO e CH₃COOH) no SADEMC. Dois testes foram realizados, usando como inóculo volumes de amostras diferentes (10,0 e 1,0 mL) nos tempos

5,15,30 e 60 minutos (Tabela 16). Não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos 8 frascos de hemocultura usados.

Tabela 16. Resultados dos testes microbiológicos realizados em meios de hemocultura (Bactec plus) após contato das bactérias com o biocida (NaClO e CH₃COOH)

Microorganismos	Cultura em meio líquido (Bactec plus)			
	Período de contato (min.)			
	5	15	30	60
Mistura dos microorganismos (Tabela 1) usando 10,0 mL como volume de inóculo	acb	acb	acb	Acb
Mistura dos microorganismos (Tabela 1) usando 1,0 mL como volume de inóculo	acb	acb	acb	Acb

acb: ausência de crescimento bacteriano

5.9.3 Sistema Automático de Tratamento e Descarte de Meios de Cultura Contaminados (SADEMC)

Para avaliar o protótipo do sistema automatizado de descarte de meios de cultura contaminados (SADEMC) foram selecionados processos que são listados a seguir, juntamente com as justificativas. As configurações de tempo, rotação, carga e volume para o funcionamento da máquina são descritas, tendo como base os resultados obtidos, e outros dados aleatórios em decorréncias do dimensionamento do sistema. O tempo de 15 minutos e a velocidade de rotação do cesto (8 ± 1 rpm) no procedimento (SADEMC) para a limpeza das placas (Figura 28) foram considerados ideais e como tendo margem de segurança adequada.

A velocidade do triturador (3.500 rpm) foi aleatoriamente determinada na construção do protótipo, tendo-se em conta a sua função (homogeneizar totalmente os meios triturando todo e qualquer resíduo de etiquetas ou discos de antibióticos). O volume da carga foi determinado em função do tamanho do cesto, sendo que pode ser carregada com 138 placas de 140 x 15mm ou 338 de 90 x 15 mm, com uma variação de 5 a 10 placas. Da mesma forma, o peso dos meios de cultura contaminados também varia e é de 4,5 a 5,0 kg por carga. O volume do biocida é fixo em 100 litros para uma carga completa.

- **Segurança do operador na preparação do biocida**

O teste deste processo verificou a eficiência dos dois motores que injetam automaticamente a água e as soluções (NaClO e CH₃COOH), constituintes do biocida, juntamente com os hidrômetros (dois) que controlam o volume de entrada para processar a mistura dentro da máquina (base com cuba de aço inox). O operador somente conecta a mangueira ao frasco contendo as soluções de NaClO a 12% e CH₃COOH a 10 % (vinagre forte), não tendo contato direto com as soluções. Todas as operações são comandadas através de um painel de controle;

- **Segurança no momento da operação (desinfecção e lavagem dos meios e placas descartáveis)**

O fechamento da máquina (com tampo de acrílico) com vedação de borracha contra a parte superior da base em cuba de aço inox, sob pressão mecânica, impede o vazamento da solução biocida, protegendo o operador.

- **Qualidade do plástico**

O sistema de jatos (bicos) de alta pressão com quatro pontos na parte interna da base de aço inox da máquina e os movimentos giratórios do cesto fazem com que as condições de limpeza das peças de plástico sejam evidenciadas visualmente e satisfaçam os critérios mínimos exigidos pelos compradores (empresas) de plástico para reciclagem;

- **Controle da qualidade do produto final**

Os restos de discos de antibiograma no resíduo são reduzidos por um triturador de múltiplas facas acoplado no interior do corpo da máquina a uma mistura totalmente homogeneizada.

O pH médio do resíduo após 30 dias de funcionamento oscilou em torno de 6,7 com DP de 0,1. O pH quase neutro e a homogeneidade da solução preenchem condições ideais para descartar o líquido na rede coletora de esgoto, não causando impacto ambiental nem comprometendo o tratamento no destino final.

Tempo (min.)	Percentual de placas limpas
1	0
2	0
3	0
4	0
5	1
6	2
7	5
8	10
9	20
10	40
11	60
12	80
13	93
14	99
15	100
16	100
17	100
18	100
19	100
20	100



Figura 38. Curva de desempenho na limpeza das placas de Petri no SADEMC.

Tabela 17. Especificações, tempo, rotações, peso e volume do SADEMC

Especificações	Variáveis
Tempo do procedimento	15 minutos
Rotações do cesto	8 rpm
Rotações do triturador	3.500 rpm
Volume da carga	56 litros \pm 5
Número de placas 140 x 15 mm	138 \pm 5
Número de placas 90 x 15 mm	338 \pm 10
Peso dos meios de cultura contaminados	4,62 \pm 5 Kg
Peso da carga total	9,68 kg
Volume de biocida	100 litros

5.9.4 Diferenças e custo/benefício do sistema automatizado em comparação com autoclave

Os resultados obtidos no experimento do SADEMC (processo químico) foram comparados com os do uso da autoclave (processo físico) na rotina de um laboratório de análises clínicas (Laboratório Alvaro, Cascavel, PR), tendo como objetivo demonstrar as vantagens econômicas do sistema. O Laboratório Álvaro, no seu setor de microbiologia (Quadro 1) descarta mensalmente 268 kg de meio de cultura contaminados, acondicionados em 3.450 (152,5 kg) de placas de Petri descartáveis, perfazendo 420,5 kg de resíduo de microbiologia. Após autoclavação e considerando-se o custo de

R\$ 2,16/hora de processo conforme artigo publicado (RUTALLA, 2002) e a quantidade de 50 procedimentos por mês (capacidade da autoclave em uso), há consumo de 50 sacos plásticos especiais (R\$ 0,43/saco). Na seqüência os sacos plásticos contendo meios de cultura e placas são recolhidas por empresa terceirizada (custo de R\$ 1,75/Kg) para tratamento e destino final.

Quadro 1. Comparativo econômico entre o SADEMC e AUTOCLAVE no Laboratório Alvaro

	SADEMC	AUTOCLAVE
Consumo de energia	R\$ 30,00	R\$ 1.296,00
Sacos plásticos autoclaváveis	R\$ 0,00	R\$ 258,00
Coleta de lixo (empresa terceirizada) 420,5 kg	R\$ 0,00	R\$ 8.830,44
Biocida	R\$ 990,00	R\$ 0,00
Placas descartáveis a reciclar	R\$ 915,00 (+)	R\$ 0,00
Total (saldo)	R\$ 75,00	R\$ 10.384,44*

*equivalente a 5.465 dólares americano/ano

Por outro lado, processando no SADEMC a mesma carga tratada por autoclavagem, considerando, porém, 25 cargas por mês, devido à capacidade da máquina, o consumo de energia é reduzido (R\$ 0,10/rotina), e o custo do biocida é de R\$ 3,30/rotina. O aproveitamento das placas descartáveis (152,5 kg/mês) para reciclagem gera um retorno de R\$ 82,50 por mês.

5.9.5 Avaliação da eficiência do SADEMC para redução da carga bacteriana, através da técnica de PCR em tempo real

As quantificações bacterianas (rRNA) pré- tratamento com SADEMC foram próximas à mediana de $3,8 \times 10^8$ UFC/mL. Houve uma variação de $1,9 \times 10^7$ a $2,7 \times 10^{10}$ UFC/mL. O produto final, pós-tratamento com o SADEMC apresentou uma concentração mediana de $2,6 \times 10^4$ UFC/mL, com variações de 245 a $2,7 \times 10^6$ UFC/mL (Tabela 18). As 10 amostras submetidas a cultura em BACTEC não apresentaram crescimento bacteriano, reproduzindo os resultados obtidos no experimento (item 5.9.2, pág. 102).

Tabela 18. Contagem bacteriana por PCR em tempo real, pré e pós SADEMC

Amostra	Pré SADEMC	Pós SADEMC	Redução	Redução (%)
1	59104578	473	$5,9 \times 10^7$	99,9992
2	635575488	1770	$6,4 \times 10^8$	99,99972
3	41698156	1170	$4,2 \times 10^7$	99,99719
4	19516563	245	$2,0 \times 10^7$	99,99874
5	69115250	1645	$6,9 \times 10^7$	99,99762
6	6355477507	51041	$6,4 \times 10^9$	99,9992
7	10848365568	2734206	$1,1 \times 10^{10}$	99,9748
8	127568912	362752	$1,3 \times 10^8$	99,71564
9	3743996928	99269	$3,7 \times 10^9$	99,99735
10	27026714624	239132	$2,7 \times 10^{10}$	99,99912
Média			$4,9 \times 10^9$	

6. DISCUSSÃO

A escolha de um desinfetante atendendo especificamente às necessidades de um laboratório de microbiologia de diminuir a carga microbiana de meios de cultura contaminados, preenchendo os requisitos básicos estabelecidos pela legislação em vigor (Lei nº. 6.360, de 23 de setembro de 1976; Decreto nº. 79.094, de 5 de janeiro de 1977; Portaria nº. 15, de 23 de agosto de 1988) é uma preocupação de todos os profissionais da área de análises clínicas.

A maioria (>98%) dos laboratórios de análises clínicas do Brasil, principalmente os da iniciativa privada, não realiza cultura para bacilos álcool-ácido resistentes (micobactérias) e os poucos que processam esta análise têm dela uma demanda quase que inexpressiva comparada com a de solicitações de culturas em geral. Estes materiais, tanto os biológicos (escarro, urina, líquido cefalorraquidiano e outros) bem como os meios semeados, negativos e positivos, em função da quantidade, poderão ser segregados e autoclavados antes de serem remetidos para o descarte. Por esta razão, no presente trabalho, não foram usados cepas padrões de micobactérias para avaliação do sistema proposto, mas somente de microorganismos que são habitualmente isolados na prática clínica de laboratórios de microbiologia. A avaliação de três cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* usadas nos experimentos (tabela 1) se justifica pela preocupação com a eventual resistência a biocidas (McDONNELL, 1999). As cepas usadas têm padrões de sensibilidade diferentes, sendo uma delas (*S. aureus* ATCC 25923) resistente à oxacilina.

A escolha do desinfetante nesta pesquisa foi baseada em seu amplo espectro antimicrobiano; rapidez de ação; propriedades não irritantes; não implicação em danos ao operador e ao meio ambiente; facilidade de uso; presença de pouco ou nenhum odor; custo econômico, e alta solubilidade em água (RUTALA *et al.*, 1998; HIRATA; MANCINI-FILHO, 2002). Os experimentos de que trata a tese tiveram como objetivo avaliar diferentes concentrações da solução aquosa de hipoclorito de sódio (NaClO), com ou sem neutralização com ácido acético comercial como proposta alternativa para redução da carga bacteriana. Sua ação bactericida, virucida e fungicida fazem-na um biocida de

escolha como desinfetante de superfície nos serviços de saúde e a sua combinação com ácido acético (CH_3COOH), com a resultante acidificação, potencializa sua atividade bactericida pelo aumento da concentração de ácido hipocloroso (HClO) dissociado (KUROIWA *et al.*, 2003). Outros fatores importantes, tais como a oncogenicidade e a mutagenicidade, não foram analisados uma vez que vasta literatura comprova a ausência destes efeitos (MORRIS, 1992; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; DUNNICK; MELNICK, 1993). Os métodos propostos e desenvolvidos no experimento, o PCA e o PLA, mostram correlação proporcional entre os diâmetros de inibição de crescimento microbiano e a concentração de NaClO . Os resultados obtidos sugerem que ambos os métodos são eficientes para a avaliação semiquantitativa da ação de biocidas em meios de cultura contaminados. O PCA e o PLA podem suprir a inexistência de um método de avaliação de biocidas específicos para a desinfecção de meios de cultura semi-sólidos e líquidos contaminados. Ambos os métodos medem a concentração inibitória nos halos de inibição do crescimento bacteriano. Usando diversas concentrações da solução de biocida é possível estabelecer a concentração inibitória mínima do agente químico.

Os resultados obtidos pelo método de difusão em Ágar PLA, quando analisados, mostram que todos os microorganismos se comportam de maneira muito semelhante frente às diferentes concentrações de NaClO , com exceção da *Candida albicans*, que em todas as concentrações apresenta diâmetro de halo de inibição muito maior que os demais microorganismos. Esta constatação é também observada com o método de difusão em Ágar PCA. Para o PLA, frente a todos os microorganismos observa-se um halo de inibição a partir da concentração de 0,062% (62 ppm) de NaClO . Portanto, a concentração de 0,062% (62 ppm) pode ser considerada a concentração mínima inibitória ideal para o uso de uma solução aquosa de NaClO .

As análises pelo método PCA permitem observar que a concentração mínima para inibir o crescimento bacteriano é de 0,125% (125 ppm). Observou-se aumento significativo do halo de inibição frente à associação de NaClO e CH_3COOH , e que para todos os microorganismos estudados e a mistura deles, ocorreu inibição significativa e com margem de segurança a partir da

concentração de 0,2% (200 ppm) de H₃COOH e de 0,25% (250 ppm) de NaClO. Esta pode ser considerada, portanto, a concentração inibitória mínima com máxima segurança para inibir o crescimento bacteriano e conseqüentemente reduzir a carga bacteriana dos meios de cultura que foram utilizados para diagnóstico (descarte microbiológico infectante).

O método PLA apresenta diâmetros sempre maiores que os do PCA; por sua vez o PCA aponta melhores resultados quando se utiliza o biocida combinado, em relação ao uso de NaClO isolado, mas somente nas concentrações baixas, havendo equivalência nas concentrações mais altas. No entanto, como se emprega um perfurador de características diferentes em cada método, pode não ser adequado comparar o PCA e o PLA.

Foram observadas algumas diferenças importantes com relação às metodologias quando se analisou o comportamento individual das cepas bacterianas. O *Bacillus subtilis* ATCC 19659 e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 comportaram-se de forma idêntica em todas as concentrações de biocida; o método PLA apresenta resultados de diâmetro do halo de inibição sempre maiores que os demais métodos. Por sua vez, são elas as únicas cepas de bactérias em que o método PCA não acusa diferença entre o uso do biocida combinado e o do NaClO isolado (tabela 12). Para a *Salmonella typhimurium* ATCC 140828 e a *Shigella flexneri* ATCC 12022, assim como com as outras cepas bacterianas, a análise do uso do NaClO pelo PCA apresentou os piores resultados entre os três métodos (PCA e PLA com NaClO e PCA com o biocida combinado NaClO e CH₃COOH) (tabela 12). Os resultados apresentados não demonstraram diferença significativa entre os diâmetros de halos de inibição entre os *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, IAL 1607 e IAL 1604). Em todas as concentrações ocorreu o mesmo comportamento.

As maiores áreas de inibição de crescimento, observadas nos testes de PLA, podem ser resultantes da sobreposição das áreas de diferentes concentrações. Certos autores usaram métodos similares ao PCA para avaliar atividade antimicrobiana e citotóxica de desinfetantes na terapêutica de feridas (UTYAMA, 2003).

Quando o hipoclorito de sódio foi usado combinado com ácido acético no método PCA, foi observado que as concentrações de 0,25% (250 ppm) de NaClO e 0,2% (200 ppm) de CH₃COOH eram efetivas para inibir o crescimento de todas as cepas bacterianas (tabela 11). Estas concentrações da mistura destes 2 agentes químicos apresentam os melhores resultados de redução da carga microbiana em meios de cultura contaminados em laboratórios de análises clínicas. Utilizando-se o biocida na menor concentração efetiva obtém-se maior segurança tanto para o operador quanto para o meio ambiente. A redução para pH de 6,7, próximo ao neutro, condição que contempla as normas de emissão de efluentes para a rede de esgoto, aumenta e potencializa sensivelmente a eficiência da ação do hipoclorito de sódio, pela formação de HClO (ácido hipocloroso) em meio ácido, aumentando a concentração de cloro na sua forma ativa. Estes resultados são concordantes com outros estudos, embora com metodologias diferentes, segundo as quais, o NaClO também foi acidificado com uma solução de CH₃COOH (KUROIWA *et al.*, 2003). Esta combinação biocida também foi usada pela agência americana de meio ambiente (U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005), medindo a atividade esporicida pelo método da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), que demonstrou que o NaClO é efetivo para reduzir até sete logaritmos de uma concentração de esporos de *Bacillus subtilis*, quando aplicado em superfícies não porosas, ajustando-se o pH para 7 com ácido acético (AOAC INTERNATIONAL, 2005).

As técnicas para a pesquisa e contagem de agentes bacterianos em geral, ao longo da história, sempre utilizaram a microscopia e a cultura em meios especiais acompanhada de reações bioquímicas. Classicamente a viabilidade de bactérias é definida por sua capacidade de formar colônias em meios de cultura sólidos ou de proliferar em meios de cultura líquidos. Estes ensaios são morosos e habitualmente finalizados após 24 ou 48 horas. Com o advento da biologia molecular, tornou-se possível realizar a detecção e a quantificação bacteriana com boa especificidade e acurácia no tempo de até 3 horas. Tem sido demonstrado que a reação em cadeia pela polimerase com detecção em tempo real (*Real-Time PCR*) é a metodologia de escolha para a quantificação de

microorganismos (GREISEN; LOEFFELHOLZ; LEONG, 1994; FEY *et al.*, 2004). Apesar do alto custo da implementação inicial, a sensibilidade, o menor manuseio e a conseqüente redução do risco de contaminação têm estimulado o uso de PCR em tempo real para essa finalidade (BUSTIN, 2000).

Ao avaliar a integridade de DNA nas soluções diluídas em NaClO, foi observada evidente degradação do material genômico quando exposto a concentrações finais de 0,25 % do biocida (Figura 22). Dados semelhantes foram observados ao se estudar a desinfecção de superfícies sólidas com concentrações ainda maiores (PRINCE; ANDRUS, 1992). Foi possível observar esta degradação de DNA com o PCR em tempo real. Apesar de ser bem conhecida existe a possibilidade de contaminação por DNA das enzimas utilizadas na PCR (SCHMIDT; PACE; PACE, 1991; BÖTTGER, 1990; HUGHES; BECK; SKUCE, 1994), não foi observado produto de amplificação nas amostras-controles negativos utilizando reações de detecção de DNA íntegro por SYBR®-Green.

A reação de PCR em tempo real é bastante sensível para a detecção e quantificação de bactérias (MCINGVALE, ELHANAFI; DRAKE, 2002; MCKILLIP; JAYKUS; DRAKE, 1998). Neste trabalho, foi utilizado um método quantitativo eficiente para demonstrar a ação dos bactericidas citados e usados no presente sistema de tratamento de meios de cultura contaminados. Foi possível observar diminuição da emissão de fluorescência, empregando a PCR com detecção em tempo real e o SYBR-Green. (Figura 22). Estes dados sugerem ter havido degradação do DNA dos microorganismos após o tratamento com o NaClO. A utilização deste corante já tinha sido proposta (PHE; DOSSOT; BLOCK, 2004) e apresentou a mesma eficácia para a avaliação de viabilidade celular que a aqui observada

Não há padronização de método molecular para a quantificação de viabilidade celular; entretanto, tem sido sugerido que a utilização de mRNA possa ser um marcador mais específico da viabilidade celular, pois sua degradação progride até a completa ausência de mRNA após um período de 16 horas, tempo este menor que o necessário para a degradação do DNA (SHERIDAN *et al.*, 1998). Por este motivo, no segundo momento, foi utilizada a RT-PCR com

sondas específicas para rRNA pelo sistema TaqMan®. Como o objetivo era avaliar quantitativamente a contaminação dos meios de cultura, nesse trabalho foi necessário estabelecer qual o limite mínimo de quantificação da reação. Assim, observou-se que até a concentração equivalente à do tubo 4 da escala de MacFarland, foi possível verificar correlação direta entre concentração bacteriana e poder de detecção da reação, sem a necessidade de diluição das amostras a serem estudadas. Assim, foi possível avaliar o grau de redução de carga microbiana pelo sistema quando utilizando soluções iniciais de até o equivalente a 1.200×10^6 UFC/mL. Do mesmo modo, observou-se que o método utilizado é eficaz para verificar a eficiência de reação a partir de número equivalente a 150 UFC/mL (Figuras 27, 28 e 29)

Observou-se redução do número de microorganismos nos meios de cultura após uso do biocida. Previamente, tinha sido demonstrada a correlação direta da quantificação de rRNA com a viabilidade bacteriana após a exposição a processos de desinfecção mais intensos. A presença de rRNA em controles de reação positiva do ensaio sugere degradação quase total destes microorganismos (MCKILLIP; JAYKUS; DRAKE, 1998).

Sheridan e colaboradores, ao avaliar a viabilidade celular pela detecção de RNA, observaram que após utilizar temperatura em tempos variados ou etanol a 50 ou 67%, pode haver presença de mRNA detectável dependendo do método e tempo de exposição aos agentes biocidas (SHERIDAN *et al.*, 1998). Entretanto o rRNA permanece detectável independentemente das condições avaliadas. A redução de rRNA observada no presente trabalho sugere que a degradação bacteriana com hipoclorito e ácido acético deve ser ainda mais intensa do que com os métodos citados acima, que empregam calor ou etanol.

A quantificação de RNA para avaliar a viabilidade bacteriana tem sido utilizada em amostras clínicas (BELLIN *et al.*, 2001; SHARMA; CARLSON, 2000) ou mesmo na avaliação de descontaminação de superfícies planas laboratoriais (BUTTNER; CRUZ-PEREZ; STETZENBACH, 2001). Entretanto, inexistem relatos de estudos em meios de cultura contaminados.

A observação de degradação do material genômico dos microorganismos expostos ao NaClO em superfícies sólidas tem apresentado resultados

semelhantes aos observados no presente estudo; contudo, alguns métodos de avaliação usados, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), apresentam capacidade de quantificação inferior à do método utilizado em nosso estudo (PRINCE; ANDRUS, 1992). A degradação da estrutura dos ácidos nucleicos foi observada em concentrações menores do que as relatadas em outros modelos experimentais na confirmação dos produtos da PCR em tempo real (ESTRELA *et al.*, 2003). É importante ressaltar que a inviabilidade celular deve ocorrer antes da degradação do DNA. Assim, é muito provável que a célula se torne inviável em tempo inferior ou em concentração menor de NaClO do que a aqui observada (MASTERS 1994; JOSEPHSON,1993). A quantificação dos microorganismos a partir do rRNA em tempo real aplicado a meios de cultura contaminados submetidos ao SADEMC demonstrou uma redução significativa após o tratamento. A redução observada no SADEMC foi superior ao determinado pela RDC no. 306/2004 preconizado pela ANVISA para classificar como efetivo método de tratamento de material contaminado (TECHNICAL ASSISTANCE MANUAL, 1994). Observamos que, independentemente da carga inicial de microorganismos, a concentração final de rRNA ficou próxima a 1.000 UFC/mL.

Através dos resultados da cultura em BACTEC (ausência de crescimento bacteriano em todas as amostras) é possível inferir que, apesar dos resultados de PCR detectarem quantitativamente a presença de rRNA, as bactérias podem ser consideradas mortas ou inviáveis.

Diversos são os parâmetros que afetam a esterilização dos resíduos de microbiologia quando se usa a autoclave como meio físico (pressão e calor) de redução da carga microbiana. Alguns autores (RUTALA; STIEGEL; SARUBBI, 1982) têm demonstrado que a grande maioria de laboratórios e hospitais da Carolina do Norte (USA) usa padrões de tempo e de temperatura que são recomendados para artigos que têm contato direto com o vapor (por exemplo, 121°C por 15 minutos). Conclusões de experimentos mostraram que quando são usados sacos de polipropileno como recipientes para acondicionar os resíduos para posterior autoclavação, considerando que a evidência de esterilização é a eliminação de *Bacillus stearothermophilus*, o tempo mínimo do ciclo de esterilização foi de 90 minutos. Durante os experimentos deste trabalho, foram

consultados diversos laboratórios em todo o território nacional (dados não publicados) e observou-se que 100% dos laboratórios de análises clínicas usam 15 minutos e 121°C como padrão de tempo e temperatura para esterilizar sacos de polipropileno com resíduos de microbiologia.

Com base nos experimentos realizados e observando cada uma das vantagens e desvantagens, foram selecionados 13 itens, contemplando: segurança, meio ambiente, tempo de operação, controle de qualidade e aspectos financeiros (economia de R\$ 10.309,00/ano equivalente a 5.727 dólares americanos) e que são apresentados a seguir (Quadro 2):

Quadro 2. Vantagens e desvantagens do SADEMC e AUTOCLAVE

	SADEMC	AUTOCLAVE
Segurança	Processo fechado	Processo fechado
	Temperatura 25-30°C	Temperatura 120°C
	Sem pressão interna	Alta pressão interna
Meio Ambiente	Resíduo homogêneo diluído	Plástico compactado e
	- pH neutro na rede coletora de esgoto	descartado no meio ambiente
Reciclagem (plástico)	Efetiva	Não é reciclado
Odor	Sem odor	Odor desagradável
Tempo de operação	15 minutos	90 minutos
Carga	56 a 60 litros	Diversos
Manutenção	Semestral	Anual
Controle de qualidade	Cultura ou PCR	Fitas e ampolas
Consumo de energia/ano	R\$ 30,00	R\$ 1.296,00
Sacos plásticos autoclaváveis	R\$ 0,00	R\$ 258,00
Coleta de lixo (empresa terceirizada) 420,5 kg	R\$ 0,00	R\$ 8.830,44
Biocida	R\$ 990,00	R\$ 0,00
Placas descartáveis a reciclar	R\$ 915,00 (+)	R\$ 0,00

Ao se iniciar a pesquisa, um objetivo foi traçado: desenvolver um equipamento para reduzir a carga microbiana dos meios contaminados no setor de microbiologia e para o descarte seguro dos mesmos. Tal objetivo foi alcançado; um protótipo foi construído e através da análise de testes os resultados se mostraram satisfatórios. Como objetivo secundário do trabalho, definiu-se que o projeto deveria estar o mais próximo possível da realidade técnica e econômica dos laboratórios de médio e pequeno porte. Tal meta fez com que se procurassem, durante todo o processo de desenvolvimento, alternativas para tornar o menor possível o custo total de mecanização de todos os processos. Neste sentido, o SADEMC possui custo relativamente baixo, se comparado com outros equipamentos, o que traz como benefício ao proprietário de laboratório a possibilidade de recuperar rapidamente o investimento empregado na sua aquisição.

7. CONCLUSÕES

- O método de difusão em Ágar PCA mostrou-se adequado como teste *in vitro* para avaliar a eficiência de um biocida para uso específico em descarte de meios de cultura contaminados em laboratórios de microbiologia.
- O biocida proposto (ácido acético a 0,2% e hipoclorito de sódio a 0,25%, pH 6,7) mostrou-se efetivo para reduzir a carga microbiana de meios de cultura contaminados em laboratório de microbiologia. O tempo de exposição de 15 minutos no SADEMC é suficiente para reduzir a carga bacteriana aos níveis preconizados pela ANVISA.
- Os resultados obtidos demonstram que o SADEMC é um método alternativo eficiente para fazer tratamento químico dos meios de cultura contaminados, com redução da carga bacteriana conforme preconizado pela ANVISA.
- Considerando-se o desempenho nos diversos itens selecionados, o SADEMC poderá substituir com vantagens o processo físico (AUTOCLAVE) usado nos laboratórios de microbiologia.
- A redução da carga bacteriana observada no SADEMC, avaliada pela PCR em tempo real, foi superior ao determinado pela RDC no. 306/2004 (nível III de inativação microbiana – apêndice IV) preconizado pela ANVISA para classificar como efetivo um método alternativo para o tratamento de resíduos de microbiologia contaminados.

8. CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO

Este estudo poderá contribuir para estabelecer uma rotina alternativa de tratamento e descarte de meios de cultura contaminados com bactérias e fungos provenientes de laboratórios de análises clínicas, centros de pesquisas, hospitais e universidades.

A proposta padroniza novas metodologias para avaliar a concentração inibitória mínima do agente químico (biocida) sobre meios de cultura sólidos e líquidos; a redução da carga microbiana, por meio de um sistema automatizado, e o controle microbiológico por técnicas de biologia molecular (PCR em tempo real quantitativo), contemplando as exigências preconizadas pela ANVISA na RDC n° 306/2004 e aceitas internacionalmente.

O sistema inovador de redução da carga microbiana por meio de equipamento automatizado (SADEMC) viabiliza a redução no consumo de energia elétrica e aumenta a segurança do operador (do laboratório). O SADEMC poderá dispensar a necessidade de recorrer a empresa coletora de lixo hospitalar, reduzindo riscos e custos e poderá propiciar 100% de reciclagem do material plástico. O destino do produto final descartado após as análises, ou seja, a rede coletora de esgotos poderá evitar impacto negativo ao meio ambiente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, P. H. Chlorine and organochlorine compounds. **Science**, v. 265, n. 5176, p. 1155, 1994.

ANDREWS, J. M.; WISE, R. Comparison of the Etest with a conventional Ágar dilution method in evaluating the in vitro activity of moxifloxacin. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, n. 2, p. 257-258, 2000.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004. Disponível em: http://www.webodonto.com/downloads/diversos/anvisa_resolucao_rdc_n306/2004_rss.pdf. 2004. Acesso em: 02/08/2005.

ARAÚJO, G. F.; BATISTA, J. E.; MONETEIRO NETO, V.; ROCHA, A. M. F.; LIMA, L. A. M. L. Eficácia *in vitro* do ácido acético em *Pseudomonas* spp. **Acta Cir. Bras.**, v.10, n. 4, p. 201-203, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR - 10004: Resíduos sólidos - classificação. ABNT, 1987.

_____. NBR - 10004: Resíduos sólidos - classificação. ABNT, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International, Association of Official Analytical Chemists. 17. Arlington,VA: Association of Official Analytical Chemists, 2002.

_____. Official Methods of Analysis of AOAC International 18 Edition, 2005 - Dr. William Horwitz, Editor, Dr. George W. Latimer, Jr., Assistant Editor - published by AOAC INTERNATIONAL - MARYLAND, USA.

AUGUSTIN, M.; LI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. **J. Pharm. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 55-64, 2004.

BAGORDO, F.; DE DONNO, A. D.; AMBROSIO, G.; VILLANOVA, L.; GABUTTI, G. Evaluation of the bactericidal activity of a disinfectant containing sodium hypochlorite (Amiclor). **Ann. Ig**, v. 15, n. 6, p. 885-894, 2003.

BELLIN, T.; PULZ, M.; MATUSSEK, A.; HEMPEN, H. G.; GUNZER, F. Rapid Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* by Real-Time PCR with Fluorescent Hybridization Probes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 370-374, 2001.

BERLANSTEIN, L. R. The Industrial Revolution and work in nineteenth-century Europe. London, England: Routledge, 1992. ISBN 041507052X.

BEST, M.; NEUHAUSER, D. Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. **Qual. Saf Health Care**, v. 13, n. 3, p. 233-234, 2004.

BLOCH, S. S. Disinfection, sterilization, and preservation. Historical review, p. 3-17. In S.Block (ed). 4th. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 1991.

BÖTTGER, E. C. Frequent contamination of Taq polymerase with DNA. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 6, p. 1258-1259, 1990.

BRIDSON, E. Y. Iatrogenic epidemics of puerperal fever in the 18th and 19th centuries. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 53, n. 2, p. 134-139, 1996.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E. The Merck index. 11ed. USA: Rahway, 1989. 1606p.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

BUTTNER, P. M.; CRUZ-PEREZ, P.; STETZENBACH, L. D. Enhanced Detection of Surface-Associated Bacteria in Indoor Environments by Quantitative PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 2564-2570, 2001.

CANADIAN STANDARDS ASSOCIATION Guidelines for the Management of Biomedical Waste in the Northwest Territories. Disponível em: <http://www.enr.gov.nt.ca/library/pdf/eps/biomedical_waste.pdf>, 2005. Acesso em: 28/10/2005.

CAPLAN, R. Dr. Oliver Wendell Holmes. **Iowa Med.**, v. 84, n. 7, p. 311, 1994.

CAVANNA, D.; ROCCHIETTA, S. Claude Louis BERTHOLLET (1748-1882). Physician and chemist. **Panminerva Med.**, v. 3, p. 127-131, 1961.

CHRISTMAN, K. The History of Chlorine (Chlorine Chemists Council). Disponível em: http://c3.org/chlorine_knowledge_center/history.html, 1998. Acesso em 2/08/2005.

CIORLIA, S. L. A.; ZANETA, D. M. T. Significado Epidemiológico dos Acidentes de Trabalho com Material Biológico: Hepatites B e C em Profissionais da Saúde. **Rev. Bras. Med.Trab.**, v. 2, n. 3, p. 191-199, 2004.

COLE, E. C.; RUTALA, W. A. Bacterial numbers on penicylinders used in disinfectant testing: use of 24 hour adjusted broth cultures. **J. Assoc. Off Anal. Chem.**, v. 71, n. 1, p. 9-11, 1988.

COLE, E. C.; RUTALA, W. A.; SAMSA, G. P. Disinfectant testing using a modified use-dilution method: collaborative study. **J. Assoc. Off Anal. Chem.**, v. 71, n. 6, p. 1187-1194, 1988.

COMLURB. História da Limpeza Urbana. Disponível em: http://www2.rio.rj.gov.br/comlurb/emp_hist.htm?id=1, 2005. Acesso em: 11/10/2005.

CONAMA Comissão Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano.cfm?codlegitipo=3>, 2005. Acesso em: 07/10/2005.

CONSTITUIÇÃO FEDERAL. Disponível em: http://www.dji.com.br/constituicao_federal/cf.htm. 1988. Acesso em: 23/08/2005.

CTBio-FIOCRUZ. Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

DEANE, P. The first industrial revolution. 2d ed. Cambridge Eng.: Cambridge University Press, 1979.

DECRETO nº 79.094, de 05 de janeiro de 1977. Disponível em: <http://www.consultifarma.com/legils/Decreto%2079094%20de%2005.01.1977.pdf>. Acesso em: 25/07/2006.

DERRY, T. K. Revolução Industrial. Disponível em: <http://www.consulteme.com.br/historia/reindr.htm>, 1986. Acesso em: 05/09/2005.

DUNNICK, J. K.; MELNICK, R. L. Assessment of Carcinogenic Potential of Chlorinated Water: Experimental Studies of Chlorine, Chloramine, and Trihalomethanes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 10, p. 817-822, 1993.

DYCHDALA, G. R. Chlorine and Chlorine compounds. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 151 p.

DYCHDALA, G. R. Disinfection, sterilization, and preservation. Block SS. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 157 p.

ELLIOTT, S. K.; KEETON, A.; HOLT, A. Medical students' knowledge of sharp injuries. **J. Hosp. Infect.**, v. 60, n. 4, p. 374-377, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M.; ANAISSIE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETER J, RINALDI M. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 2, p. 314-319, 1995.

ESTRELA, C.; RIBEIRO, R. G.; ESTRELA, C. R.; PÉCORA, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 1, p. 58-62, 2003.

FARR, J. *The Industrial Revolution in Europe, 1750-1914*. Detroit: Thomson/Gale, 2003. ISBN 0787660469.

FEARNE, C.; KELLY, J.; HABEL, J.; DRAKE, D. P. Needle injuries as a cause of non-accidental injury. **Arch. Dis. Child**, v. 77, n. 2, p. 187, 1997.

FELSKE, A.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L. Spatial distribution of 16S rRNA levels from uncultured acidobacteria in soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 118-122, 2000.

FEY, A.; EICHLER, S.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; MANFRED, G. H.; GUZMÁN, C. A. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 6, p. 3618-3623, 2004.

FORTIN, N. Y.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Anal. Biochem.**, v. 289, n. 2, p. 281-288, 2001.

GODFREY, K. Sharp practice. **Nurs. Times**, v. 97, n. 2, p. 22-24, 2001.

GREISEN, K. M.; LOEFFELHOLZ, A. P.; LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, p. 335-351, 1994.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs,02). *In*: _____. Medical Encyclopedia Inc. New York:1955.

GUNTER, W. M. R. Minimização de resíduos e educação ambiental. *In*: Seminário Nacional de resíduos sólidos e limpeza pública. *In*: _____. Curitiba:2000.

HARRINGTON, J. M.; SHANNON, H. S. Incidence of tuberculosis, hepatitis, brucellosis, and shigellosis in British medical laboratory workers. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 6012, p. 759-762, 1976.

HAWTHORNE, R. M., Jr. Henry Drysdale Dakin, biochemist (1880-1952): the option of obscurity. **Perspect. Biol. Med.**, v. 26, n. 4, p. 553-566, 1983.

HIGGINS, C. S.; MURTOUGH, S.M.; WILLIAMSON, E.; HIOM, S. J.; PAYNE, D. J.; RUSSELL, A. D.; WALSH, T. R. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, n. 6, p. 308-315, 2001.

HIRATA, M. H.; MANCINI, J. F. Manual de Biossegurança. São Paulo - SP - Brasil: Editora Manole Ltda, 2002a. Cap. 2 , p. 25-26.

HIRATA, M. H.; MANCINI-FILHO, J. Manual de Biossegurança. 1a.Ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2002. 55 p.

HOBAN, V. Needlestick injuries. **Nurs.Times**, v. 101, n. 14, p. 18-20, 2005.

HOFFMAN, P. N. Laboratory safety in the United Kingdom. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 281, n. 3, p. 303-312, 1994.

HORTWITZ, W.; LATIMER, W. G. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18 ed. MARYLAND, USA. AOAC INTERNATIONAL, 2005. 19 p.

HUGHES, M. S.; BECK, L. A.; SKUCE, R. A. Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA polymerase. v. 32, n. 8, p. 2007-2008, 1994.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Censo demográfico. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/default.shtm>. 2000. Acesso em: 14/10/2005.

IBGE Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saneamento básico: limpeza urbana e coleta de lixo. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condiçãodevida/pnsb/lixo_coletado/defaultlixo.shtm, 2002. Acesso em: 10/08/2005.

JAY, V. Ignaz Semmelweis and the conquest of puerperal sepsis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 123, n. 7, p. 561-562, 1999.

JOHNSON, K. R.; BRADEN, C. R.; CAIRNS, K. L.; FIELD, K. W.; COLOMBEL, A. C.; YANG, Z.; WOODLEY, C. L.; MORLOCK, G. P.; WEBER, A. M.; BOUDREAU, Y.; BELL, T. A.; ONORATO, I. M.; VALWAY, S. E.; STEHR-GREEN, P. A. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from medical waste. **JAMA**, v. 284, n. 13, p. 1683-1688, 2000.

JOSEPHSON, K.L., GERBA, C.P., AND PEPPER, I.L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 3513-3515, 1993.

KLEIN, M.; DEFOREST, A. The inactivation of viruses by germicides. **Chem. Specialists Manuf. Assoc. Proc.**, n. 49, p. 116-8, 1963.

KUROIWA, K.; NAKAYAMA, H.; KUWAHARA, T.; TAMAGAWA, K.; HATTORI, K.; MURAKAMI, K.; KORAI, H.; OHNISHI, Y. Augmenting effect of acetic acid for acidification on bactericidal activity of hypochlorite solution. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 1, January 2003, pp. 46-49 (4).

KUSKE, C. R.; BANTON, K.L.; ADORADA, D. L.; STARK, P. C.; HILL, K. K.; JACKSON, P. J. Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 7, p. 2463-2472, 1998.

KWOK, W. M.; RALPH, W. J. The use of chemical disinfectants in dental prosthetics. **Aust. Dent. J.**, v. 29, n. 3, p. 180-183, 1984.

LAMBERT R. J. W.; JOHNSTON M. D.; HANLON G. W.; DENYER S. P. Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures - synergy or addition? **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 4, p. 747-759, 2003.

LANGE, J. Ignaz Semmelweis--"Savior of Mothers". Long fight for recognition. **Fortschr. Med.**, v. 115, n. 33, p. 601997.

LARGURA, A.; PASSADORE, L. F.; RODRIGUES, A. C.; SOUSA, M. G.; SALADINO, R. S.; CARBONE, P. H.; MARASSI, A.; SANNAZZARO, C. A. C.; HIRATA, M. H. Análise crítica da pseudosepticemia e falso negativo: valor diagnóstico das hemoculturas. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, v. 37, n. 1, p. 11-14, 2005.

LEE, D. H.; MILES, R. J.; PERRY, B. F. The mycoplasmacidal properties of sodium hypochlorite. **J. Hyg. (Lond)**, n. 95, p. 243-253, 1985.

LEE, J. M.; BOTTEMAN, M. F.; XANTHAKOS, N.; NICKLASSON L. Needlestick injuries in the United States. Epidemiologic, economic, and quality of life issues. **AAOHN. J.**, v. 53, n. 3, p. 117-133, 2005.

LEI Nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. (Publicado no D.O.U. de 24.9.1976, pág. 12647). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_6360_76.pdf. Acesso em: 18/03/2006.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147-179, 1999.

MALKIN, M.; FUMETO, M. The end of Chlorine. Disponível em: http://c3.org/chlorine_issues/disinfection/rachelchlor.html#fumento, 1996. Acesso em: 27/10/2005.

MARINO, C. G. G.; EL-FAR, F.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Cut and puncture accidents involving health care workers exposed to biological materials. **Braz. J. Infect. Dis.**, n. 5, p. 235-242, 2001.

MARISCAL, A.; CARNERO-VARO, M.; GÓMEZ-ARACENA, J.; FERNÁNDEZ-CREHUET, J. Development and testing of a microbiological assay to detect residual effects of disinfectant on hard surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 8, p. 3717-3720, 1999.

MASTERS, C.I., SHALLCROSS, J.A., AND MACKEY, B.M. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **J. Appl. Bacteriol.** 77, 73-79, 1994

MATHIAS, P.; DAVIS, J. A. INSTITUTO ITALIANO DI STUDI FILOSOFICI. The First industrial revolutions. Oxford, UK: B. Blackwell, 1990. ISBN 0631160388.

MAYNARD, C.; BERTHIAUME, F.; LEMARCHAND, K.; HAREL, J.; PAYMENT, P.; BAYARDELLE, P.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, n. 12, p. 8548-8557, 2005.

MAZZOLA, P. G.; VESSONI, P. T. C. Eficácia dos agentes físicos e químicos no programa de limpeza, desinfecção e esterilização em ambientes de saúde.: Saúde da população. Controle da Infecção Hospitalar. CNPq. Prêmio Jovem Cientista, 2000.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. ***Clin. Microbiol. Rev.***, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MCINGVALE, S. C.; ELHANAFI, D.; DRAKE, A. Optimization of Reverse Transcriptase PCR To Detect Viable Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli*. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 68, p. 799-806, 2002.

MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L.; DRAKE, M. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 64, p. 4264-4268, 1998.

MELZER, S. M.; VERMUND, S. H.; SHELOV, S. P. Needle injuries among pediatric housestaff physicians in New York City. ***Pediatrics***, v. 84, n. 2, p. 211-214, 1989.

MENTZ, T. C. The use of sodium hypochlorite as a general endodontic medicament. ***Int. Endod. J.***, v. 15, n. 3, p. 132-136, 1982.

MEYER, K. F.; EDDIE, B. Laboratory Infections due to Brucella. ***J. Infect. Dis.***, v. 68, p. 24-32, 1941.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. Dia do Gari. Disponível em: <http://www.ufg.br/datas/431>. 2005. Acesso em: 11/10/2005.

MINTZ, E. D. Safe water treatment and storage in the home: a practical new strategy to prevent waterborne disease. **JAMA**, v. 273, n. 12, 1995.

MONTEIRO, J. H. P. Manual de Gerenciamento Integrado de resíduos sólidos. *In*: _____. Rio de Janeiro: 2001.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. Química-orgânica. 4. ed. Lisboa: Fundação Gulbekian, 1983.

MORRIS, R. D. Chlorination, Chlorination Byproducts and Cancer: A Meta-analysis. **Am. J. Public Health**, v. 82, n. 7, p. 955-963, 1992.

MURTOUGH, S. M., HIOM, S. J., PALMER, M; RUSSELL, A. D. Biocid rotation in the healthcare setting: is there a case for policy implementation? **J. Hosp. Infect.**, v. 48, p. 1-6, 2001.

NADKARNI, M. A.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER. N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology**, 148. Pt 1 (2002): p. 257-266.

NATHAN, P.; LAW, E. J.; MURPHY, D. F. A laboratory method for the selection of topical antimicrobial agents to treat infected burn wounds. **Burns**, v. 4, p. 177-178, 1978.

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard-fifth Edition M7-A5 NCCLS,Wayne,PA, 2001.

NETO, P. N. CONFERÊNCIA DE ESTOCOLMO. Disponível em: <http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/sitamb/cfestoc/apresent.htm>. 2005. Acesso em: 16/08/2005.

NOVAES, E. S. Antecedentes. Disponível em: <http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/agenda21/anteced/index.htm>, 2005. Acesso em: 09/08/2005.

OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; BOHRA, L. K.; PHEBUS, R.K.; YAMASHIRO, C. T.; PASZKO-KOLVA, C.; FLOOD, S. J. A.; SARGEANT, J. M.; GILLESPIE, J. R. PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 9, p. 3389-3396, 1998.

OKUBO, K.; URAKAMI, H.; TAMARA, A. Comparison of bactericidal activities of acid electrolyzed water and acid sodium hypochlorite. **Journal of the Japanese Society of Environmental Infections**. v. 13, p. 184-188, 1998.

PAPAGEORGIU, G. T.; MOCE-LLIVINA, L.; JOFRE, J. New method for evaluation of virucidal activity of antiseptics and disinfectants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 12, p. 5844-5848, 2001.

PECORA, J. D.; MURGEL, C. A. F.; SAVIOLI, R. N.; COSTA, W. F.; VANSAN, L. P. Estudo sobre o shelf life da solução de dakin. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 3-7, 1987.

PHE, M. H.; DOSSOT, M.; BLOCK, J. C. Chlorination effect on the fluorescence of nucleic acid staining dyes. **Water Res.**, v. 38, n. 17, p. 3729-3737, 2004.

PIDO, B.; KAGIMU, M. Prevalence of hepatitis B virus (HBV) infection among Makerere University medical students. **Afr. Health Sci.**, v. 5, n. 2, p. 93-98, 2005.

PORTARIA nº 15, de 23 de agosto de 1988. (DOU de 05/09/88). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm. Acesso em: 12/08/2006.

PRINCE, A. M.; ANDRUS, L. PCR: how to kill unwanted DNA
1. **Biotechniques**, v. 12, n. 3, p. 358-360, 1992.

RAPPARINI, C. Riscos profissionais (acidentes de trabalho). Disponível em: <http://www.riscobiologico.org/riscos/acidentes.htm>. 2005. Acesso em: 23/08/2005.

REBELLO, P. R. Bioética e biorrisco: abordagem transdisciplinar. In: S.VALLE ; J. L. TELLES (Eds.). Resíduos em serviços de saúde. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2003. p. 391-412.

RICHEY, H. G. Química orgânica. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1986, 418p.

RICHMOND, J. Y.; MCKINNEY, R. W. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 4th ed. Washington: U. S. G. P. O, 1999.

RITZKOWSKY, A. Accidental needle injuries of medical personnel. **Dtsch.Med Wochenschr.**, v. 119, n. 45, p. 1563-1564, 1994.

ROBAZZI, M. L. C. C. Contribuição ao estudo sobre coletadores de lixo: acidentes de trabalho ocorrido em Ribeirão Preto, estado de São Paulo, no período de 1986 a 1988. 1991. - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

RODE, L. J. ; WILLIAMS, M. G. Utility of sodium hypochlorite for ultrastructure study of bacterial spore integuments. **J. Bacteriol.**, v. 92, n. 6, p. 1772-1778, 1966.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 794-803, 2003.

RUSSELL, A. D.; GOULD, G. W. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.**, v. 17, p. 167S-195S, 1988.

RUTALA, W. A.; STIEGEL, M. M.; SARUBBI, JR. Decontamination of laboratory microbiological waste by steam sterilization. **Appl Environ Microbiol.** 1982 June; v. 43, n. 6, p. 1311–1316.

RUTALA, W. A. Draft guideline for selection and use of disinfectants. **Am. J. Infect. Control.**, v. 17, n. 1, p. 24A-38A, 1989.

RUTALA, W. A. APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994, 1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. **Am. J. Infect. Control**, v. 24, n. 4, p. 313-342, 1996.

RUTALA, W. A.; MAYHALL, C. G. Medical waste. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 13, n. 1, p. 38-48, 1992.

RUTALA W. A.; COLE, E. C.; THOMANN, C. A.; WEBER, D. J. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 19, n. 5, p. 323-327, 1998.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 597-610, 1997.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection and sterilization in health care facilities: what clinicians need to know. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 5, p. 702-709, 2004.

RUTALA, W. A. The benefits of surface disinfection. **Am. J. Infect. Control**, v. 33, n. 7, p. 434-435, 2005.

RYDELL, J. Needlestick safety and prevention in North Dakota. Prairie. **Rose.**, v. 73, n. 4, p. 21, 2004.

SANDERS, T. G. Development and environment: Brazil and the Stockholm Conference. v. 17, no. 7. Hanover, N.H.: **American Universities Field Staff**, 1973.

SATTAR, D. A.; SPRINGTORPE, V. S. Survival and disinfectant inactivation of the human immunodeficiency virus. **Rev. Infect. Dis.**, n. 13, p. 430-47, 1991.

SCHMIDT, T. M.; PACE, B.; PACE, N. R. Detection of DNA contamination in Taq polymerase. **Biotechniques**, v. 11, n. 2, p. 176-177, 1991.

SHAMPO, M. A. ; KYLE, R. A. Claude Louis Berthollet. **JAMA**, v. 233, n. 13, p. 1369-1375.

SHARMA, K. V.; CARLSON, S. Simultaneous Detection of *Salmonella* Strains and *Escherichia coli* O157:H7 with Fluorogenic PCR and Single-Enrichment-Broth Culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 12, p. 3717-3720, 2000.

SHARMA, V. K.; DEAN-NYSTROM, E. A.; CASEY, T. A. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli*. **Mol. Cell Probes**, v. 13, n. 4, p. 291-302, 1999.

SHERIDAN, G. E. C.; MASTERS, C. I.; SHALLCROSS, J. A.; MACKEY, B. M. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**, 1313-1318,1998.

SHIAO, J. S. C.; MCLAWS, M. L.; HUANG, K. Y.; KO, W. C.; GUO, Y. L. Prevalence of nonreporting behavior of sharps injuries in Taiwanese health care workers. **Am. J. Infect. Control**, v. 27, n. 3, p. 254-257, 1999.

SILVERMAN, J.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; ZERVOS, M. J. Comparative in vitro activity of antiseptics and disinfectants versus clinical isolates of *Candida* species. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, n. 20, p. 676-84, 1999.

SMITH, D. R.; LEGGAT, P. A. Needlestick and sharps injuries among nursing students. **J. Adv. Nurs.**, v. 51, n. 5, p. 449-455, 2005.

SULKIN, S. E. Survey of laboratory-acquired infections. **Am. J. Public. Health**, v. 41, n. 7, p. 769-781, 1951.

SULKIN, S. E. ; PIKE, R. M. Viral Infections Contracted in the Laboratory. **New Engl. J. Med.**, v. 241, n. 5, p. 205-213, 1949.

SWERDLOW, D. L.; MINTZ, E. D.; RODRIGUEZ, M.; TEJADA, E.; OCAMPO, C.; ESPEJO, L. GREENE, K. D.; SALDANA, W.; TAUXE, R. V. *et al.* Waterborne transmission of epidemic cholera in Trujillo, Peru: lessons for a continent at risk. **Lancet**, v. 340, n. 8810, p. 20-21, 1992.

TECHNICAL ASSISTANCE MANUAL. (1994). State Regulatory Oversight of Medical Waste Treatment Technologies,1994.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Comparative Health Effects Assessment of Drinking Water Treatment Technologies.: EPA Publ.No.570/988-009 (Washington, D.C.: EPA, 1988), 1979.

_____. National Homeland Security Research Center Office of Research and Development. Building Decontamination Alternatives Publication # EPA 600/R-05/036, March 2005.

TYAMA, I. K. A. Avaliação antimicrobiana e citotóxica do vinagre e do ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas, Ribeirão Preto, 2003 (dissertação de mestrado).

VU, H.; MCCOY, L. F.; CARINO, E.; WASHINGTON, J.; DANG, T.; VILLARREAL, C.; ROSENBLATT, J.; MANESS, C.; GOODHEART, R.; HEGGERS, J.P. Burn Wound Infection Susceptibilities to Topical Agents: The Nathan's Ágar Well Diffusion Technique. **P&T**, v. 27, n. 8, p. 390-396, 2002.

WEISMANN, H. Risk of HIV infection after needle injuries. **Dtsch. Med Wochenschr.**, v. 121, n. 19, p. A141996.

WENTZ, M.; LLOYD, A. C. Experimental removal of stains. **Textile Chemist and Colourist**, v. 7, p. 179-183, 1975.

WILLIAMS, N. D.; RUSSELL, A. D. The effects of some halogen-containing compounds on *Bacillus subtilis* endospores. **J. Appl. Bacteriol.**, n. 70, p. 427-36, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1999). Environmental Health Criteria 216. Disinfectants and disinfectant by-products. International programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph.

