

Universidade Brasil
Campus de Fernandópolis

THAIS NOGUEIRA GONZAGA

ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA DA APLICAÇÃO DO OZÔNIO
COMO DESINFETANTE EM RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE

TECHNICAL FEASIBILITY STUDY OF OZONE APPLICATION AS A
DISINFECTANT IN WASTE PROVENIENT FROM HEALTHCARE SERVICES

Fernandópolis, SP

2017

Thais Nogueira Gonzaga

ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA DA APLICAÇÃO DO OZÔNIO COMO
DESINFETANTE EM RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE

Orientadora: Prof.^a Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Fernandópolis, SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonzaga, Thais Nogueira

G651e Estudo de viabilidade técnica da aplicação do ozônio como desinfetante em resíduos de serviços de saúde / Thais Nogueira Gonzaga. – Fernandópolis, 2017.

60 f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, da Universidade de Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani

1. Micro-organismos. 2. Desinfecção. 3. Ozonização.
I. Título.

CDD 363.7288

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA DA APLICAÇÃO DO OZÔNIO COMO DESINFETANTE EM RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE”**

Autor(es):

Discente: Thais Nogueira Gonzaga

Assinatura: Thais N. Gonzaga

Orientadora: Dora Inés Kozusny-Andreani

Assinatura: [Assinatura]

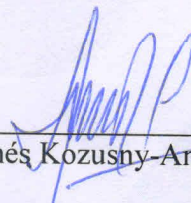
Data: 31/maio/2017

TERMO DE APROVAÇÃO

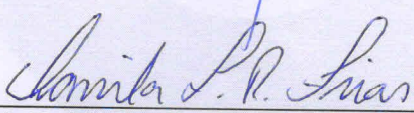
THAIS NOGUEIRA GONZAGA

**ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA DA APLICAÇÃO DO OZÔNIO COMO
DESINFETANTE EM RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE**

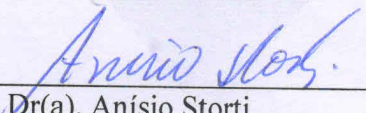
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof(a). Dr(a) Dora Inés Kozusny-Andreani (Presidente)



Prof(a). Dr(a) Danila Fernanda Rodrigues Frias



Prof(a). Dr(a) Anísio Storti

Fernandópolis, 31 de maio de 2017.

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Dora Inés Kozusny-Andreani

Dedico esse trabalho aos que amo: minha filha (intensamente), meu companheiro (mais do que ele imagina), minha irmã e meus pais (incondicionalmente) e meus amigos (os de ontem, os do presente, os de amanhã, os de sempre).

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida, amor proteção.

Aos meus pais, José Humberto Gonzaga e Irene Nogueira Gonzaga, por terem me conduzido nessa jornada que se chama existência, pelo amor imensurável que deu a ela todo sentido, por lutarem e torcerem para o meu sucesso sempre e por segurarem o bastão da maternidade nas horas em que não pude exercer essa função.

À minha irmã Thássia Nogueira Gonzaga, pelo amor, pela paciência, por acreditar no meu potencial, pelas constantes palavras de incentivo, pelo suporte emocional e pela leitura interessada deste texto.

À minha filha, Ana Isa Gonzaga do Nascimento, por ser motivo diário de minha alegria, por me impulsionar a seguir em frente sempre e buscar ser melhor a cada dia, por ter estado comigo desde a gestação até a finalização deste trabalho e por ter suportado a minha ausência em tantos momentos (mas você, minha vida, “passarinho”).

Ao meu esposo, Vagner Pereira do Nascimento, pelos doces, pelo amor e seus sabores, pela força, pelo otimismo, pelo auxílio na coleta e no transporte das amostras necessárias a este estudo e pela ternura dada a mim.

À professora Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani, pelo carinho, cuidado e compreensão, pela orientação segura e precisa, generosidade, paciência e confiança.

Ao professor Dr. Renato Amaro Zângaro, pela necessária orientação na elaboração do projeto de pesquisa deste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Andreani Junior, pelas sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

À professora Dra. Danila Fernanda Rodrigues Frias, pela cordialidade, pelos apontamentos enriquecedores apresentados tanto no exame de qualificação quanto na defesa.

Ao professor Dr. Anísio Storti pelas sugestões engrandecedoras e sábias apresentadas durante a defesa.

À Pró-reitoria de Extensão e Cultura (PROEXC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela flexibilização de horários de serviço para o curso das disciplinas do mestrado e realização dos experimentos necessários à escrita desta dissertação.

Ao Programa de Apoio à Qualificação da UFU (QUALI-UFU), pelo auxílio financeiro concedido para a realização desta pesquisa em parte do tempo de realização do mestrado.

Ao hospital particular de Uberlândia e sua equipe, pela disponibilidade em ceder os resíduos usados nesse estudo.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, Glicely Andrea Bonfim Santos e Charlene Alcântara Faustino, pela simpatia, pela cordialidade e pelo empenho em colaborar com a realização dos experimentos.

À Ecreziana Santos da Silva, secretária do Programa de Pós-graduação, pela cordialidade no atendimento e atenção ao dar encaminhamento às solicitações diversas.

Às amigas, Kelma Patrícia de Souza, Mairny Abadia Ferreira Antônio dos Santos, Patrícia de Oliveira Portela e Selma de Andrade Coelho, companheiras de jornada, que tornaram essa trajetória mais rica e mais leve.

A todas as pessoas que, de longe ou de perto, acompanharam minha caminhada durante o período de curso do mestrado e que sempre torceram pelo meu sucesso.

*“O homem é a mais insana das espécies.
Adora um Deus invisível e mata a
Natureza visível... sem perceber que a
Natureza que ele mata é esse Deus
invisível que ele adora”
(Hubert Reeves)*

ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA DA APLICAÇÃO DO OZÔNIO COMO DESINFETANTE EM RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE

RESUMO

Os resíduos de serviços de saúde (RSS) compreendem os materiais descartados e não tratados, procedentes de atividades de cuidados de saúde com seres humanos ou animais, que são iminentes transmissores de agentes infecciosos. Existe interesse em identificar uma tecnologia confiável para o manejo e para o descarte seguro desses resíduos em função dos riscos potenciais que apresentam tanto a saúde pública quanto ao meio ambiente. A utilização do ozônio tem se intensificado por ser um desinfetante com capacidade de inativar diversos micro-organismos sem a geração de produtos tóxicos resultantes de sua aplicação. Por isso, o objetivo geral deste estudo foi investigar a viabilidade técnica da aplicação de ozônio como bactericida e fungicida em amostras de RSS potencialmente infectantes. As amostras para o estudo foram coletadas em um hospital particular, em Uberlândia/MG. Os micro-organismos presentes nas amostras foram identificados e quantificados. Para a realização das análises microbiológicas e para o tratamento com ozônio o material foi particulado e homogeneizado. As análises microbiológicas foram realizadas antes e após a ozonização. Para a realização dos testes de desinfecção foram retirados 10,0 g de cada uma das amostras particuladas e foram submetidos à ozonização por intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos com doses de 140,0; 280,0; 420,0; 560,0 e 700,0 mg. L⁻¹ de ozônio, respectivamente. Verificou-se presença de mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Candida albicans* e *Rhizopus spp*. A ação desinfetante do ozônio foi evidenciada, uma vez que todos os micro-organismos presentes nas amostras de resíduos analisadas foram eliminados, quando expostos ao gás por um intervalo de tempo 20 (vinte) minutos e, nos primeiros cinco minutos de submissão das amostras ao ozônio, a carga microbiana atingiu reduções superiores a 98%.

Palavras-chave: micro-organismos, desinfecção, ozonização.

TECHNICAL FEASIBILITY STUDY OF OZONE APPLICATION AS A DISINFECTANT IN WASTE PROVENIENT FROM HEALTHCARE SERVICES

ABSTRACT

Healthcare waste (HCW) comprises discarded and untreated materials from healthcare activities with humans or animals, which are imminent transmitters of infectious agents. There is an interest in identifying a reliable technology for safely managing and disposing of this waste due to the potential risks that it represents both to public health and to the environment. The use of ozone has become more frequent, as it is a disinfectant capable of inactivating several microorganisms without generating toxic products from its application. Therefore, the general goal of this research was to evaluate the technical viability of using ozone as a bactericide and fungicide in potentially infectious HCW samples. The samples intended for the study were collected in a private hospital in Uberlândia/MG. The microorganisms existing in the samples were identified and quantified. The material was particulated and homogenized in order to perform the microbiological analysis and for the ozone treatment. Microbiological analysis were performed before and after ozonation. To perform the disinfection tests, 10.0 g of each of the particulate samples were removed and subjected to ozonation for 5, 10, 15, 20 and 25 minutes intervals with 140.0; 280.0; 420.0; 560.0 and 700.0 mg. L⁻¹ doses of ozone, respectively. The presence of total mesophyles, total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Candida albicans* and *Rhizopus spp* was verified. Ozone disinfectant action was evidenced, since all microorganisms existing in the analyzed waste samples were completely eliminated when exposed to the gas for a period of twenty minutes and, during the first 20 (five minutes) of ozone treatment, the microbial load of the samples reached reductions greater than 98%.

Keywords: micro-organisms, disinfection, ozonation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a: Distribuição da contagem de mesófilos totais, coliformes totais, coliformes termotolerantes e E. Coli de acordo com as amostras dos locais avaliados.	42
Figura 1b: Distribuição da contagem de P. aeruginosa, Proteus spp., Staphylococcus aureus e Staphylococcus spp de acordo com as amostras dos locais avaliados.	42
Figura 1c: Distribuição da contagem de Candida albicans e Rhizopus spp. de acordo com as amostras dos locais avaliados.	43
Figura 2: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS dos três locais avaliados no estudo sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.	47
Figura 3: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio referente às amostras de RSS dos três locais avaliados no estudo (excluindo a contagem inicial).....	48
Figura 4: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS da UTI adulto sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.....	49
Figura 5: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio das amostras de RSS da UTI adulto (excluindo a contagem inicial).	49
Figura 6: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS da unidade de internação sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.	50
Figura 7: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio das amostras de RSS da unidade de internação (excluindo a contagem inicial).	50
Figura 8: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS da unidade de isolamento sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.	51
Figura 9: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio das amostras de RSS da unidade de isolamento (excluindo a contagem inicial).	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média \pm desvio padrão da contagem microbiana de amostras de RSS: Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI adulto), Unidade de Internação e Unidade de Isolamento de um hospital particular do Município de Uberlândia, MG, Brasil.	38
Tabela 2: Média \pm desvio padrão da contagem microbiana das amostras de RSS: Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI adulto), Unidade de Internação e Unidade de Isolamento de um hospital particular do Município de Uberlândia, MG, Brasil, de acordo com a ação antimicrobiana do ozônio.	44
Tabela 3: Média \pm desvio padrão do percentual de redução da carga microbiana devido à ação do ozônio nas amostras de RSS: Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI adulto), Unidade de Internação e Unidade de Isolamento de um hospital particular do Município de Uberlândia, MG, Brasil.	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
RSS	Resíduos de Serviços de Saúde
RSU	Resíduo Sólido Urbano
ABRELPE	Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
NMP	Número mais provável
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI Adulto	Unidade de Terapia Intensiva Adulto
MG	Minas Gerais
SP	São Paulo
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
APHA	American Public Health Association
NaCl	Cloreto de Sódio
O₃	Ozônio
O₂	Oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Relevância do tema e estado atual da arte	19
1.2. Fundamentação	20
1.2.1. Os resíduos sólidos urbanos (RSU)	20
1.2.2. Os resíduos de serviços de saúde (RSS).....	21
1.2.3. Micro-organismos comumente encontrados em RSS	22
1.2.4. Tratamento de resíduos de serviços de saúde.....	23
1.2.5. Desinfecção por ozonização	25
1.2.5.1. O ozônio	25
1.2.5.2. Mecanismos da ação do ozônio	27
1.2.5.3. Aplicações do ozônio na desinfecção.....	28
1.3. Objetivo geral e objetivos específicos	31
1.3.1. Objetivo geral	31
1.3.2. Objetivos específicos.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1. Tipo de pesquisa	32
2.2. Origem e coleta das amostras de resíduos de serviços de saúde	32
2.3. Meios de cultura e análises microbiológicas	33
2.4. Tratamento das amostras de RSS com ozônio	34
2.2.1 A câmara de ozonização	34
2.2.2. Entrada e manutenção de O ₃ na câmara	35
2.5. Cálculo da variação das cargas microbianas nas amostras.....	36
2.6. Análise estatística dos dados	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1. Micro-organismos presentes nas amostras.....	37
3.2. Quantificação e análise comparativa dos micro-organismos presentes nas amostras de RSS	37
3.3. Avaliação da ação do ozônio como desinfetante	43
3.4. Avaliação do custo benefício de tecnologias de tratamento de resíduos de serviços de saúde	52
4. CONCLUSÕES.....	54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
----------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relevância do tema e estado atual da arte

O descarte inapropriado de resíduos tem gerado passivos ambientais capazes de colocar em risco e comprometer os recursos naturais e a condição de vida das atuais e futuras gerações [1]. Os resíduos de serviços de saúde (RSS) se inserem dentro desta problemática.

As resoluções nº 306/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [2] e a nº 358/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) [3] definem RSS como aqueles gerados em todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal incluindo, por exemplo, os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo, laboratórios analíticos de produtos para a saúde, serviços de medicina legal, drogarias e farmácias, inclusive as de manipulação, estabelecimentos de ensino e pesquisa na área da saúde, unidades móveis de atendimento à saúde, entre outros similares.

Segundo Martins [4], os resíduos sólidos urbanos (RSU) gerados pelas instituições de saúde são considerados perigosos pelo aspecto de contaminação biológica e química, sendo o risco biológico o mais preocupante devido à variedade de micro-organismos patogênicos geralmente presentes nesses resíduos, representando risco à saúde e ao meio ambiente.

Destaca-se ainda o potencial de contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas pelo lançamento de RSS em lixões ou aterros controlados, o que também proporciona riscos aos catadores, principalmente por meio de lesões provocadas por materiais cortantes e/ou perfurantes, por ingestão de alimentos contaminados ou ainda, por aspiração de material particulado contaminado em suspensão [1].

Os preceitos aplicáveis aos RSS instituem que determinadas classes de resíduos precisam passar por tratamento prévio à sua disposição definitiva a fim de que não apresentem perigo aos trabalhadores da área, à saúde pública e ao meio ambiente [5].

As tecnologias de desinfecção mais conhecidas para tratamento dos resíduos de serviços de saúde do grupo A, potencialmente infectantes, são a incineração, a esterilização por autoclave e a esterilização por micro-ondas [1].

A técnica de descontaminação com a utilização de ozônio (O_3) é ainda alternativa pouco utilizada [6]. Esse gás é um forte agente desinfetante com efeito sobre grande diversidade de organismos patogênicos, incluindo bactérias, vírus e protozoários, apresentado eficiência germicida [7].

Devido à comprovada ação antimicrobiana do ozônio e à geração de produtos não prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana resultantes de sua aplicação, torna-se interessante investigar a eficácia de seu emprego em processos de desinfecção de resíduos de serviços de saúde potencialmente infectantes.

Para esse fim, foi realizado um estudo, de natureza quantitativa e experimental, desenvolvido por meio de revisão bibliográfica dos conceitos substanciais ao tema, acompanhado de um programa experimental para investigar a eficácia do ozônio, em particular, como agente bactericida e fungicida.

1.2. Fundamentação

1.2.1. Os resíduos sólidos urbanos (RSU)

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) [8] os resíduos sólidos são definidos como aqueles que se encontram nos estados sólido e semissólido, resultantes de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição.

Conforme a Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE) [9], a geração total de RSU no Brasil em 2015 foi de aproximadamente 79,9 milhões de toneladas.

Os resíduos sólidos podem provocar alterações intensas no solo, na água e no ar, quando dispostos de maneira inadequada, além da probabilidade de provocarem danos a todas as formas de vida, ocasionando problemas que podem aparecer, com frequência, anos após a disposição inicial. Podem ainda favorecer o aumento de vetores, que são veiculadores ou reservatórios de certos patógenos [10].

1.2.2. Os resíduos de serviços de saúde (RSS)

Dentre os diversos tipos de resíduos produzidos pelo homem, os gerados pelos serviços de saúde requerem atenção especial por apresentarem elevado risco de contaminação que oferecem ao ambiente em que são gerados, bem como aos locais onde são dispostos no meio ambiente. Quando em condições favoráveis, os vetores existentes nos resíduos, têm a sobrevivência mantida em períodos que variam de dias a anos [10].

A ABRELPE [9] quantificou 260,1 mil toneladas de RSS coletadas em 2015 pelos municípios do Brasil. Destaca-se que desse total anual 180,4 mil toneladas foram coletadas na Região Sudeste e que destas, aproximadamente, 40 mil, pertencem ao Estado de Minas Gerais.

As resoluções nº 306/04 da ANVISA [2] e nº 358/05 do CONAMA [3] classificam os RSS em cinco grupos: A, B, C, D e E. O grupo A, engloba os componentes com possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção como, por exemplo, placas e lâminas de laboratório, carcaças, peças anatômicas, tecidos, bolsas transfusionais contendo sangue, entre outras.

Os RSS podem apresentar riscos para a saúde humana quando são manuseados de maneira inadequada. Os riscos diretos e específicos para a saúde dizem respeito, principalmente, aos trabalhadores neste domínio, que devem ser protegidos do contato com os resíduos. Para o público em geral, os principais riscos para a saúde são indiretos e decorrem da propagação de vetores de doenças, principalmente moscas e ratos, quando não são gerenciados de forma apropriada [11]. Esses resíduos podem conter uma grande variedade de micro-organismos patogênicos que geralmente incluem bactérias, vírus, fungos e partículas protéicas infecciosas (príon) [12-14].

A presença desses micro-organismos constitui-se em uma fonte potencial de epidemias e de doenças decorrentes do gerenciamento inadequado e do despejo em aterros sanitários de resíduos sólidos. Os aterros municipais desses tipos de resíduos também são fontes de poluição microbiana do ar. Os micro-organismos são transportados do aterro sanitário para a atmosfera por meio do vento. Sua sobrevivência depende da resistência, das condições meteorológicas, da poluição do

ar e da permanência na atmosfera [15]. Segundo Kaźmierczuk e Bojanowicz-Bablok [16], os aterros são fontes de emissão e dispersão de aerossóis bacterianos e fúngicos, mesmo quando existe gestão correta e manutenção adequada, influenciando na qualidade do ar, em uma distância de 1000-1200 m.

Os resíduos sólidos não tratados contêm frequentemente agentes microbianos potenciais causadores de doenças infecciosas. Porém, o nível deste potencial não costuma ser avaliado; atualmente nenhum processo de tratamento pode eliminar total ou consistentemente tais riscos. No entanto, é notório que os processos de tratamento alteram a distribuição e a concentração de patógenos [17].

1.2.3. Micro-organismos comumente encontrados em RSS

Diversos micro-organismos como vírus, bactérias, protozoários e fungos podem ser encontrados em RSS do grupo A, potencialmente infectantes e causar doenças infecciosas [18].

Estudos evidenciaram que as espécies microbianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, leveduras (*Candida albicans*) e bolores são as mais prevalentes em análises microbiológicas de RSS [6,14,18-19].

As bactérias da espécie *Escherichia coli* possuem forma de bastonetes, são gram-negativas, anaeróbias facultativas que fermentam lactose, produzindo ácido e gás. São encontradas naturalmente nos tratos intestinais dos seres humanos e são indicadoras de contaminação recente de origem exclusivamente fecal [20]. *Escherichia coli* causa infecções urinária (mais comumente), abscesso no fígado, pneumonia, meningite, artrite, colecistite (infecção da vesícula), entre outras. Há também, várias cepas diferentes de *E. coli* responsáveis por quadros de diarreia (*E. coli* Enteropatogênica, *E. coli* Enterotoxonogênica, *E. coli* Enterohemorrágica e *E. coli* Enteroinvasiva), com diferentes graus de gravidade [21].

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo, aeróbico, encontrado principalmente no solo e na água, capaz de crescer em qualquer ambiente úmido, sendo resistente a muitos desinfetantes e antibióticos. Essas bactérias produzem uma endotoxina e várias exotoxinas, que são responsáveis pela maior parte de sua patogenicidade, e são consideradas modelo de patógeno oportunista [22]. Além disso, é o patógeno mais isolado de pacientes hospitalizados por mais de uma semana,

sendo causa frequente de infecções nosocomiais. As infecções pseudomonais são complicadas e podem ser fatais [23]. As doenças causadas por *P. aeruginosa* incluem otites externas, infecções respiratórias, infecções de queimaduras e dermatites [22].

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas, esféricas que formam agrupamentos irregulares como cachos de uva, anaeróbicas facultativas [22]. São as bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente. Podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal [24]. Geralmente são encontradas nas fossas nasais; podem crescer e sobreviver nas secreções e na pele, em alguns alimentos com alta pressão ou em alimentos com baixa umidade que tendem a inibir o crescimento de outros organismos [22].

As bactérias *Staphylococcus aureus* causam grande variedade de infecções em humanos, de espinhas e furúnculos a pneumonias, intoxicações alimentares e infecções em feridas cirúrgicas, sendo também importante causa de infecções hospitalares. Também produz uma toxina responsável pela síndrome do choque tóxico, uma infecção grave caracterizada por febre alta, vômitos e algumas vezes morte. A bactéria também produz uma enterotoxina que causa vômitos e náuseas quando ingerida e é considerada uma das causas mais comuns de intoxicação alimentar [22].

Já os fungos, mais notadamente as espécies patogênicas, podem crescer tanto na forma de fungos filamentosos (bolores) quanto na forma de levedura [25]. O habitat natural da maioria dos fungos é o meio ambiente, exceto a *Candida albicans*, que faz parte da flora humana normal [26]. Os fungos causam infecções chamadas de micoses e podem ser classificadas em cinco grupos de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o modo de entrada no hospedeiro: sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista [22].

1.2.4. Tratamento de resíduos de serviços de saúde

Pela resolução ANVISA nº 306/04 [2:4], o tratamento de RSS consiste:

[...] “na aplicação de método, técnica ou processo que modifique as características dos riscos inerentes aos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de contaminação, de acidentes ocupacionais ou de danos ao meio ambiente”.

Os métodos de descontaminação mais utilizados para tratamento dos RSS potencialmente infectantes são a incineração, a esterilização por autoclave e a esterilização por micro-ondas [1].

Com relação ao tratamento dado aos RSS, em 2015, do total coletado pelos municípios brasileiros, 45,7% foram para incineração, 21,9% foram tratados em autoclave, 2,5% em micro-ondas. Os demais 29,9% dos RSS coletados compreendem a destinação, sem tratamento prévio, em aterros, em valas sépticas, lixões, etc [9].

A gestão e a eliminação segura dos RSS são problemáticas devido à sua natureza infecciosa e aos elevados custos de tratamento. Em todo o mundo, a tecnologia mais comumente utilizada para tratar os resíduos sólidos é a incineração, processo que se dá pela oxidação a altas temperaturas dos resíduos. A vantagem deste método de tratamento é a redução considerável de seu volume, tornando-os irreconhecíveis [1,27-28]. Por outro lado, a incineração libera grande variedade de poluentes, incluindo dioxinas, furanos e metais pesados (chumbo, mercúrio e cádmio), gases ácidos (cloreto de hidrogênio e dióxido de enxofre), monóxido de carbono e óxido de nitrogênio [17,27,29]. Estas emissões podem ser causa de graves efeitos sobre a segurança dos trabalhadores, a saúde pública e ao meio ambiente [30-31].

A tecnologia de autoclave, que consiste na esterilização por meio da aplicação de vapor saturado, sob pressão, tem sido amplamente utilizada em instalações de saúde para descontaminar os resíduos de laboratório altamente infecciosos porque é visto como o processo mais confiável e facilmente controlável. Tipicamente, as autoclaves são usadas em hospitais para a esterilização de equipamentos médicos reutilizáveis e têm provado ser muito eficazes para esse fim. Os mesmos parâmetros do processo foram aplicados para esterilizar resíduos clínicos com a hipótese de que uma autoclave poderia ser eficaz para esterilizar os RSS [17, 29, 32]. O método danifica termicamente a estrutura celular bacteriana, incluindo a membrana externa e citoplasmática, tornando a célula não viável [22]. A inativação dos mecanismos vitais das células bacterianas depende da estrutura celular bacteriana, da temperatura e da duração da exposição ao calor a que estão expostos [33].

A esterilização por micro-ondas, outro método aplicado para o tratamento de RSS, conforme ANVISA [1:54], baseia-se na:

[...] “descontaminação dos resíduos com emissão de ondas de alta ou de baixa frequência, a uma temperatura elevada (entre 95 e 105°C). Os resíduos devem ser submetidos previamente a processo de trituração e umidificação”.

Esse processo de desinfecção apresenta como vantagem a ausência de emissão de efluentes de qualquer natureza. Não obstante, esse método não diminui o volume do resíduo após a esterilização [34].

Diante dos riscos potenciais que o manejo inadequado dos resíduos sólidos representa a saúde humana e animal, assim como ao meio ambiente, existe um interesse crescente em identificar uma tecnologia confiável para o manuseio e descarte seguro de resíduos de serviços de saúde. Os processos de tratamento envolvem a destruição ou inativação irreversível de todos os patógenos presentes e a prevenção da recontaminação subsequente ou reinfecção com organismos patogênicos [6,14,32-33,35-36].

Nos últimos anos a utilização do ozônio tem se intensificado por ser um desinfetante de amplo espectro com capacidade de inativar uma ampla gama de micro-organismos, que podem ser resistentes a outros desinfetantes [6,36-38].

A descontaminação por ozonização, alternativa de tratamento de resíduos de serviços de saúde potencialmente infectantes, é essência de estudo deste trabalho.

1.2.5. Desinfecção por ozonização

1.2.5.1. O ozônio

O ozônio, nas condições normais de temperatura e pressão é um gás, incolor que tende ao azul, diamagnético, alótropo triatômico (O_3) do oxigênio [39]. É parcialmente solúvel em água, instável e que evapora à temperatura de $-112^\circ C$, à pressão atmosférica. Possui cheiro penetrante e é facilmente detectável em concentrações muito baixas ($0,01 \text{ mg. L}^{-1}$ a $0,05 \text{ mg. L}^{-1}$). É o segundo oxidante mais forte, excedido em seu potencial de oxidação apenas pelo flúor. A característica mais significativa de sua molécula é a sua grande quantidade de energia [40].

Sua composição química foi estabelecida em 1872, pelo físico-químico suíço Christian Friedrich Schönbein. Os três átomos de oxigênio da molécula do ozônio estão arranjados em ângulo obtuso ($116^\circ 49'$), em que o oxigênio central é ligado a

dois átomos de oxigênio equidistantes por meio de uma ligação simples e outra dupla, cujo comprimento médio é de 1,28 Angström. A palavra deriva de ozein, que em grego significa odor, por causa do cheiro característico do gás [41].

O princípio de geração de O_3 mais conhecido, depende basicamente das condições de pressão, temperatura e presença da molécula de O_2 , além da energia de excitação produzida pela radiação ultravioleta. No caso específico da camada de ozônio que envolve o planeta terra, a radiação ultravioleta emitida pelo sol estimula moléculas de O_2 , induzindo a dissociação dessas, ocasionando a liberação de íons O^{\cdot} que podem se associar a outras moléculas de oxigênio formando moléculas de ozônio [42].

A produção comercial do ozônio é realizada pelo “processo corona”, que consiste em aplicar uma corrente elétrica em um fluxo gasoso de ar ou oxigênio. O campo elétrico aplicado oferece energia suficiente aos elétrons para que estes desfaçam as duplas ligações da molécula de O_2 , concebendo dois átomos de oxigênio. Esses átomos reagem com outra molécula de O_2 para formar a molécula de O_3 [40].

A taxa de dissociação das moléculas de O_2 depende, em especial, da distribuição e quantidade de energia na descarga corona, da temperatura e da vazão do gás na entrada do gerador de ozônio [43].

Existem basicamente dois sistemas de geração de ozônio: um a partir do ar e outro a partir do oxigênio puro. O ozônio utilizado na realização dos experimentos dos estudos deste trabalho foi gerado a partir de oxigênio puro em que o gerador foi alimentado através de um tanque de oxigênio líquido precedido de um evaporador. Esse procedimento apresenta rendimento maior em massa na transformação de O_2 em O_3 em comparação ao procedimento realizado com a utilização de sistema de geração de ozônio a partir do ar [40].

A concentração do ozônio é calculada considerando a relação entre a massa do gás e o volume do meio em que ele está disperso. As unidades mais utilizadas são g/m^3 , mg/L e $\mu g/mL$. Considerando a concentração do ozônio no meio ar, cuja densidade é igual a $2,14 kg/m^3$, tem-se que a concentração deste gás em m^3 equivale a 467 ppm [44].

A ação germicida do ozônio foi evidenciada na França, no final do século XIX, quando este gás começou a ser utilizado como desinfetante no tratamento de água

[40]. Em 1985 foram estimadas mais de duas mil instalações de ozônio no mundo utilizadas a fim de desinfecção [45].

O poder desinfetante desse gás é de, aproximadamente, dez vezes excedente ao do cloro, para todos os tipos de micro-organismos e é efetivo no combate a esporos e cistos que são as formas mais resistentes [40]. Os seus efeitos bactericidas foram documentados em uma grande variedade de organismos, englobando as bactérias gram-negativas e gram-positivas, bem como esporos e células vegetativas [46].

A diminuição ou a inativação da população microbiana devido à ozonização depende da concentração de ozônio, do tempo de aplicação e do micro-organismo envolvido [7].

O ozônio deve ser gerado *in situ*, para uso imediato [45], uma vez que se decompõe rapidamente [47].

Por ser o ozônio um gás instável não deixa residual danoso ao meio ambiente e seu alto poder oxidante diminui a concentração e o intervalo de tempo necessários para a desinfecção [40].

1.2.5.2. Mecanismos da ação do ozônio

O modo de ação do ozônio em combate a micro-organismos não está completamente definido. Alguns estudos sobre bactérias sugerem que o ozônio altera proteínas e ligações insaturadas de ácidos graxos na membrana celular, levando à lise celular [48].

A inativação das bactérias pode ser considerada uma reação de oxidação de vários constituintes celulares causada pelo alto potencial de oxidação do ozônio, sendo a membrana celular o primeiro alvo da oxidação e a morte ocorre devido a mudanças na permeabilidade seguida de lise da célula [40]. O ozônio pode interromper a atividade enzimática celular reagindo com grupos tiol e modifica as bases purinas e pirimidinas em ácidos nucleicos [49].

O ozônio é igualmente eficaz na destruição de vírus envelopados e não envelopados, produzindo danos no envelope e na cápside [50].

1.2.5.3. Aplicações do ozônio na desinfecção

Diversos estudos indicaram a ação desinfetante do ozônio em diferentes materiais e/ou meios como esgoto, leitos hospitalares veterinários de pequenos animais, ambientes de salas de cirurgia, dentre outros [43,51-52].

Dentre as aplicações do ozônio no meio ambiente podem ser citadas a desinfecção e tratamento de água visando a potabilidade, a desinfecção de efluentes industriais e residenciais, o tratamento de águas em piscinas, viveiros e aquários, a desinfecção e tratamento de águas provenientes de hospitais, laboratórios, indústrias farmacêutica, alimentícia e de bebidas [53].

A eficiência da desinfecção por ozônio de água proveniente de esgoto foi verificada observando a remoção de *Escherichia coli*, coliformes totais e bactérias heterotróficas. Os resultados obtidos mostraram uma diminuição de aproximadamente 90% das bactérias heterotróficas e cerca de 100% de *Escherichia coli* [54].

Também foram realizados estudos com a finalidade de avaliar o efeito do gás ozônio, dissolvido em água, sobre o *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos mostraram que o intervalo de tempo máximo para a inativação total das bactérias tratadas com água previamente ozonizada foi de 5min25s, ao passo que para a água não previamente ozonizada, foi de 23min45s, indicando o efeito antibacteriano mais rápido da água previamente ozonizada, frente ao *S. aureus* [55].

Os estudos de Garcia et al. [52] avaliaram a eficiência do gás ozônio na descontaminação de salas cirúrgicas. A análise estatística mostrou diferença altamente significativa entre as contagens antes e após o tratamento do ambiente com ozônio, atestando a excelência deste gás como agente bactericida e esporicida.

O ozônio foi avaliado como técnica alternativa na sanificação de galões de água. As embalagens foram observadas antes e após a sanificação com água ozonizada (4mg/L/2min) quanto à contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos heterotróficos, número mais provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp.* em 100 mL de solução enxaguatória. A eficiência do tratamento com utilização de ozônio nas condições testadas foi depreendida, uma vez que a contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC) de micro-organismos heterotróficos reduziu-se de 5,7/cm² para 0,003/cm², houve a negatização das análises para coliformes *Pseudomonas ssp.* e

apenas 13,3% das amostras apresentaram-se positivas para *Staphylococcus aureus* após a sanificação [56].

Canada [57] analisou a viabilidade do uso da água ozonizada no reprocessamento de dialisadores sanguíneos em serviço de hemodiálise. A diminuição intensa de ocorrência dos micro-organismos após a exposição dos dialisadores à água ozonizada foi observada, principalmente no que se refere a eliminação de micro-organismos como *E. coli*, *Streptococcus* e *Proteus mirabilis*.

Pereira et al. [58] compararam o efeito de diferentes gases, gás carbônico e hélio à concentração de 99,99% e ozônio à concentração de 0,4%, sobre o crescimento de diversas cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) em um estudo *in vitro* e concluíram que o ozônio promoveu a destruição de 100% dos espécimes.

Martins et al [6] verificaram a eficiência do ozônio no controle *in vitro* de micro-organismos isolados de resíduos de serviço de saúde como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Clostridium tetani*, *Staphylococcus sp*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* e *Clostridium sp*. A diminuição da carga microbiana com o aumento do intervalo de tempo de exposição dos micro-organismos ao ozônio foi evidenciada constatando a efetividade do ozônio como descontaminante.

Tormin et al. [59] avaliaram a propriedade bactericida do ozônio gasoso sobre as bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina e *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram que o ozônio tem efeito bactericida sobre bactérias multirresistentes, sendo este efeito proporcional à concentração e ao intervalo de tempo de exposição ao gás.

Estrela et al. [60] realizaram experimentos a fim de verificar a eficácia da adição de ozônio em um sistema de limpeza ultrassônica contra *Staphylococcus aureus* em infecções da cavidade oral. Nas condições testadas, foi evidenciada a atividade bactericida do ozônio contra *S. aureus*.

Os estudos realizados por Fontes et al. [61] objetivaram determinar se uma baixa dose de mistura gasosa ozônio/oxigênio elimina bactérias patogênicas cultivadas *in vitro*. Nas condições analisadas, uma única aplicação tópica por nebulização de uma dose baixa de ozônio inibiu completamente o crescimento de

todas as espécies bacterianas potencialmente patogênicas com resistência conhecida aos agentes antimicrobianos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. A efetiva ação bactericida do ozônio, fica, desta forma, evidenciada.

Nogales et al. [62] compararam a atividade antimicrobiana de 3 (três) diferentes concentrações de ozônio em *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. De acordo com a metodologia aplicada, depreendeu-se que o ozônio aquoso em concentração de 8 µg/mL foi mais eficiente para a eliminação das três bactérias avaliadas.

Santos et al. [63] realizaram estudo a fim de determinar a concentração e o intervalo de tempo de saturação do gás ozônio em grãos de arroz e definir o intervalo de tempo de ozonização eficaz na desinfecção de fungos e leveduras. Grãos de arroz foram inoculados com *Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.* A concentração e o intervalo de tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de arroz foram de 5 mg. L⁻¹ e 13,97 min, respectivamente, sendo observada redução de 100% na contagem de leveduras e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O ozônio mostrou-se como tecnologia propícia no controle desses micro-organismos.

As pesquisas realizadas por Rodrigues et al. [64] avaliaram a eficiência do ozônio no controle de patógenos em sementes da cultura do girassol (*Helianthus annuus L.*). Concluiu-se que o tratamento de sementes de *H. annuus*, cultivar Embrapa 122, com ozônio na concentração de 1741 ppmv (0.24 g/h), por 60 (sessenta) minutos, reduz a população fúngica de *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp* e *Penicillium sp.* sem afetar o seu potencial fisiológico. Dessa forma, evidencia-se a efetividade da ação fungicida do ozônio no controle da população analisada.

A eficiência do gás ozônio aplicado ao ar em câmara de maturação de queijos parmesão tipo Grana no controle de fungos em suspensão, na superfície de prateleiras e queijos em maturação, foi avaliada por Pinto et al [65]. O ozônio mostrou-se efetivo no controle de fungos ambientais e de superfícies, durante o processo de maturação dos queijos, uma vez que foi observada redução significativa da carga fúngica (0,74 log₁₀ na superfície dos queijos, 0,91 log₁₀ na superfície das prateleiras e de 1,5 log₁₀ no ar).

Cavalcanti et al. [66] avaliaram o uso do ozônio gasoso para sanitização de câmaras frias utilizadas para a estocagem de queijo minas frescal por 120 (cento e vinte) dias. A qualidade microbiológica do ar, das paredes e das portas da câmara foram amostradas por 60 (sessenta) dias com e sem aplicação de ozônio a concentração de 0,03 mg. L⁻¹. Foi observada redução de micro-organismos aeróbios mesófilos, bolores e fungos filamentosos de 0,81 e 1,01 ciclos logaritmos, respectivamente, no ambiente da câmara fria após a aplicação do gás ozônio e reduções decimais estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as contagens de aeróbios mesófilos nas paredes e nas portas da câmara. Isso preconiza o ozônio como uma técnica alternativa para desinfecção de ambientes.

1.3. Objetivo geral e objetivos específicos

1.3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi investigar a viabilidade técnica da aplicação de ozônio como bactericida e fungicida em amostras de resíduos de serviços de saúde potencialmente infectantes.

1.3.2. Objetivos específicos

- a) isolar, quantificar e identificar as espécies microbianas (bacterianas e fúngicas) presentes nas amostras de RSS estudadas;
- b) submeter as amostras de resíduos de serviços de saúde ao processo de ozonização por diferentes intervalos de tempo;
- c) verificar a eficácia do processo de desinfecção para diferentes intervalos de tempo de exposição das amostras dos resíduos supracitados ao ozônio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tipo de pesquisa

Este estudo, de natureza quantitativa e experimental, foi desenvolvido por meio de uma revisão bibliográfica dos conceitos fundamentais ao tema, seguido de um programa experimental, para investigar a eficácia do ozônio como fungicida e bactericida.

2.2. Origem e coleta das amostras de resíduos de serviços de saúde

Os resíduos foram coletados em um hospital particular de Uberlândia/MG. As amostragens foram obtidas de três locais distintos, com o intuito da obtenção de amostras representativas dos diferentes micro-organismos que poderiam estar presentes nos resíduos. A equipe do hospital disponibilizou a unidade de terapia intensiva adulto (UTI adulto), a unidade de internação e a unidade de isolamento para a realização da pesquisa.

As coletas foram realizadas às segundas-feiras, no período da manhã. Nas operações de coleta foram retirados 2,0 kg de RSS em cada um dos locais disponibilizados. Foram realizadas duas amostragens, nos meses de novembro e dezembro de 2016, com intervalo de aproximadamente trinta dias, totalizando seis amostras de material para o estudo.

Em todos os procedimentos de coleta do material foram utilizados os seguintes Equipamentos de Proteção Individual (EPIs): luvas, avental impermeável, touca, máscara e óculos de segurança.

Cada amostra de resíduo infectante foi acondicionada em saco plástico na cor branca leitosa, conforme normas da ABNT, de capacidade compatível com a quantidade coletada, devidamente fechado, e mantida em caixa isotérmica com gelo.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil para realização de experimentos de análises microbiológicas e de desinfecção com gás ozônio. Os procedimentos laboratoriais foram realizados sempre dentro das 24h seguintes às amostragens. No Laboratório de Microbiologia as

amostras utilizadas para o estudo foram particuladas e homogeneizadas com auxílio de tesoura e espátula esterilizadas.

2.3. Meios de cultura e análises microbiológicas

Para o cultivo de micro-organismos foram utilizados os seguintes meios de cultura: Caldo de Lauril Triptose (LTB, OXOID®), Caldo Verde Brilhante Bile (BGBB, OXOID®) ágar Triptecaseína Soja (TSA, OXOID®), ágar Eosina Azul de Metileno (EMB, OXOID®), ágar Salmonella Shigella (SS, OXOID®), ágar Sangue (TSA, OXOID®), ágar Sabouraud (HIMEDIA), ágar Baird Parker (OXOID®), ágar Cetrimide (OXOID®) e ágar seletivo para Clostridium (OXOID®), preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para análise microbiológica foi empregada a metodologia preconizada pela American Public Health Association (APHA) [67]. Inicialmente, as amostras foram particuladas e homogeneizadas com auxílio de tesoura e espátula esterilizadas, em seguida foram coletadas sub amostras de 10,0 g (em quadruplicata), para submissão à diluição seriada em 90,0 mL de solução salina (NaCl 0,5%) esterilizada.

Para a contagem de coliformes totais foram preparadas diluições seriadas de amostras dos resíduos em solução salina (NaCl, 0,85%) e uma alíquota 1,0 mL foi transferida assepticamente para uma série de tubos de ensaio contendo tubo de Durham invertido e caldo de Lauril Triptose (LTB). Os tubos foram agitados suavemente e incubados durante 48 horas a 37°C. A produção de gás e a fermentação de lactose foram observadas como reações positivas.

Os coliformes termotolerantes foram determinados empregando-se diluições seriadas e uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para tubos contendo tubo de Durham invertido e Caldo Verde Brilhante Bile (BGBB). Os tubos foram agitados suavemente e incubados durante 48 h a 44,5°C. A produção de gás e a fermentação de lactose foram observadas como reações positivas.

Para o isolamento de outras bactérias e fungos 0,1 mL de cada diluição foram inoculados em Placas de Petri sobre os meios específicos estéreis. Os inóculos foram espalhados pelas superfícies dos meios, com auxílio de alça de Drigalski e incubadas, à temperatura de 37°C, por intervalos de tempo de 24-48h. Após esse período, foram realizadas a contagem e a avaliação das características das colônias quanto à forma,

tamanho e cor. A quantificação dos micro-organismos foi expressa em unidades formadoras de colônias por grama de RSS (UFC. g⁻¹).

As bactérias e os fungos foram caracterizados, respectivamente, pela Coloração de Gram e pelo Azul de Algodão e identificados por métodos bioquímicos, de acordo com a metodologia descrita por Winn et al. [68].

Para a identificação das espécies bacterianas gram-negativas foi utilizado o sistema API 20E (Analytical Profile Index, BioMérieux) e para a caracterização das espécies bacterianas gram-positivas foram realizados os testes breaq: catalase, coagulase, DNase, oxidase e hemólise.

Todos os experimentos para as análises microbiológicas, tanto das amostras coletadas do resíduo antes do tratamento quanto para as amostras do resíduo tratado, foram realizados em quadruplicata.

2.4. Tratamento das amostras de RSS com ozônio

Para a realização dos testes de desinfecção foram retirados 10,0 g de cada uma das amostras particuladas e submetidos à ozonização, em intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos com doses de 140,0; 280,0; 420,0; 560,0 e 700,0 mg. L⁻¹ de ozônio, respectivamente.

O ozônio foi obtido por um equipamento gerador corona, Modelo Ozone & Life® (Medical System), sendo a concentração do gás limitada pelo equipamento, calibrado em uma vazão de O₃ de 28,0 mg. L⁻¹. O fluxo de entrada do gás oxigênio (O₂) utilizado foi de 1,0 L por minuto de O₂ e a temperatura do ambiente controlada entre 18-20°C durante todo o experimento. O gás ozônio foi conduzido ao recipiente de ozonização por meio de um tubo de silicone.

2.2.1 A câmara de ozonização

Foi utilizado um sistema de fumigação de ozônio modificado, proposto por Wani et al. [69]. Esta câmara foi projetada para melhorar a aplicação de ozônio nas superfícies a serem desinfetadas e para aumentar as concentrações de ozônio desejadas em seu interior, visando a redução do intervalo de tempo de exposição ao gás. A câmara

usada na ozonização foi confeccionada em vidro, em formato retangular, com dimensões de 25,5 x 25,0 x 15,3 cm (9,7 cm³ ou 9,7 L).

A câmara foi fechada na parte superior com uma tampa móvel para inserção e retirada do material. A entrada de gás foi realizada na parte superior do recipiente e a saída de gás na parte inferior, no intuito de facilitar a dispersão do gás pelo material submetido ao tratamento.

2.2.2. Entrada e manutenção de O₃ na câmara

Um procedimento padrão para a entrada e a saída do ozônio na câmara foi adotado, que se repetiu para todos os intervalos de tempo de exposição das amostras ao O₃. Os passos seguidos foram:

1. Abertura da câmara e acondicionamento do resíduo a ser tratado;
2. Fechamento da câmara e abertura dos registros de entrada e de saída do gás;
3. Conexão da mangueira de silicone do ozonizador no registro de entrada;
4. Ativação do ozonizador para a entrada do gás e saturação/homogeneização da câmara durante um intervalo de tempo de 10 (dez) minutos com o registro de saída aberto;
5. Após a saturação da câmara manteve-se a amostra exposta ao ozônio durante o intervalo de tempo pré-determinado (5, 10, 15, 20 e 25 minutos);
6. Fechamento do registro de entrada e imediata desativação do ozonizador;
7. Abertura da tampa da câmara e retirada da amostra do material tratado para realização das análises microbiológicas.

Antes e após o tratamento de cada amostra foi realizada a higienização da câmara com álcool 70%.

Finalizado cada período de ozonização foi retirada uma alíquota de 1,0 g do material tratado para a repetição das análises microbiológicas, em proporção, tanto para a massa das amostras quanto para a quantidade do diluente (1,0 g: 9,0 mL).

Em etapa posterior foram comparados os resultados microbiológicos encontrados nas amostras coletadas do resíduo antes do tratamento com os resultados obtidos nas amostras do resíduo tratado.

2.5. Cálculo da variação das cargas microbianas nas amostras

Nas amostras de resíduo tratadas *in vitro* foram avaliados os percentuais de redução da contagem microbiana devido à ação do ozônio, em função dos n intervalos de tempo de tratamento (5, 10, 15, 20 e 25 minutos), em que a contagem inicial é a contagem microbiana antes do tratamento, por meio da seguinte expressão:

$$\% \text{ de redução da carga microbiana} = \frac{(\text{contagem}_{n \text{ min}} - \text{contagem}_{\text{inicial}})}{\text{contagem}_{\text{inicial}}}$$

2.6. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram analisados por meio da análise descritiva da contagem microbiana dos agentes contidos nas amostras de resíduos de acordo com o local de coleta e com o tratamento de ozonização. Foi aplicado o teste de análise de variância com teste de comparação múltipla de Games-Howell.

Os resultados obtidos de comparação da contagem microbiana relativos às amostras de resíduos dos três locais avaliados foram reiterados por meio do emprego de gráficos de intervalo de confiança e o decréscimo da contagem microbiana nas amostras decorrente do aumento do período de exposição ao ozônio foi delineado por gráficos de linha.

Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% [70]. O software utilizado para a realização da análise foi o Minitab 17 (Minitab Inc.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Micro-organismos presentes nas amostras

O estudo realizado permitiu identificar micro-organismos potencialmente infectantes presentes nas amostras de RSS coletadas tanto na UTI adulto, quanto nas unidades de internação e isolamento, disponibilizadas para as análises, nas duas amostragens realizadas.

Verificou-se presença de bactérias como: mesófilos totais, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, de leveduras da espécie *Candida albicans* e de bolores identificados como *Rhizopus spp.* Esses resultados são equivalentes aos obtidos por Park et al. [71] que detectaram uma série de micro-organismos, incluindo *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.* em vários tipos de resíduos clínicos.

Alagoz e Kocasoy [14] realizaram análises microbiológicas em RSS para determinar a quantidade de bactérias patogênicas por métodos de contagem de colônias e detectaram bactérias coliformes, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Legionella*, leveduras e bolores.

3.2. Quantificação e análise comparativa dos micro-organismos presentes nas amostras de RSS

Os resultados do estudo da quantificação dos micro-organismos, bem como da análise comparativa dos agentes encontrados nas amostras de RSS dos três locais de coleta (UTI adulto, unidade de internação e unidade de isolamento) estão descritos a seguir.

A Tabela 1 mostra os resultados da contagem microbiana das amostras de resíduos coletadas com o objetivo de observar a presença de diferenças significativas na contagem de cada um dos micro-organismos avaliados de acordo com o ambiente de coleta.

Tabela 1: Média \pm desvio padrão da contagem microbiana de amostras de RSS: Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI adulto), Unidade de Internação e Unidade de Isolamento de um hospital particular do Município de Uberlândia, MG, Brasil.

Micro-organismo	Local de coleta			Valor P ¹
	UTI adulto	Unidade de internação	Unidade de isolamento	
Mesófilos totais	2,7.10 ⁴ \pm 1,2.10 ⁴ c	1,6.10 ⁵ \pm 3,2.10 ⁴ b	3,2.10 ⁶ \pm 1,1.10 ⁶ a	<0,001
Coliformes totais	9,8.10 ¹ \pm 5,3.10 ¹ c	5,6.10 ² \pm 1,2.10 ² b	3,9.10 ³ \pm 5,4.10 ³ a	<0,001
Coliformes termotolerantes	2,7.10 ¹ \pm 5,9.10 ⁰ b	4,3.10 ¹ \pm 1,7.10 ⁰ a	3,0.10 ² \pm 2,4.10 ² a	<0,001
<i>E. coli</i>	5,7.10 ⁰ \pm 1,0.10 ⁰ b	2,2.10 ¹ \pm 8,6.10 ⁰ a	4,5.10 ¹ \pm 2,1.10 ¹ a	<0,001
<i>P. aeruginosa</i>	6,7.10 ⁰ \pm 2,5.10 ⁰ a	9,2.10 ⁰ \pm 3,7.10 ⁰ a	3,8.10 ⁰ \pm 1,6.10 ⁰ b	0,005
<i>Proteus spp.</i>	0,0 \pm 0,0	2,5.10 ⁰ \pm 0,9.10 ⁰	7,8.10 ⁰ \pm 1,5.10 ⁰	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,8.10 ¹ \pm 1,3.10 ⁰ b	1,6.10 ¹ \pm 2,0.10 ⁰ b	4,3.10 ¹ \pm 2,2.10 ¹ a	0,007
<i>Staphylococcus spp</i>	1,6.10 ⁰ \pm 0,5.10 ⁰ b	5,7.10 ⁰ \pm 0,4.10 ⁰ a	5,7.10 ⁰ \pm 1,9.10 ⁰ a	<0,001
<i>Candida albicans</i>	4,4.10 ¹ \pm 3,8.10 ¹	1,7.10 ¹ \pm 1,0.10 ¹	2,9.10 ¹ \pm 1,6.10 ¹	0,101
<i>Rhizopus spp.</i>	1,8.10 ⁰ \pm 0,3.10 ⁰ b	4,8.10 ⁰ \pm 1,1.10 ⁰ a	2,3.10 ⁰ \pm 0,7.10 ⁰ b	<0,001

¹ Valor P referente ao teste de Análise de Variância a P<0,05. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de comparação múltipla de Games-Howell a P<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados da Tabela 1 indicam a presença de diferenças significativas em todas as comparações realizadas referentes às quantidades de micro-organismos encontrados nas amostras colhidas nos três locais de estudo, exceto para *Candida albicans* que, por sua vez, apresentou contagem semelhante nas amostras de resíduos dos três locais avaliados ($P=0,101$). A análise comparativa não foi possível de ser realizada no caso da contagem do micro-organismo da espécie *Proteus spp.*, pois não houve contagem microbiana para tal nas amostras coletadas na UTI adulto, impossibilitando a comparação com as demais amostras dos locais avaliados.

A contagem de mesófilos totais e coliformes totais apresentou diferenças significativas quando as amostras dos locais foram comparadas, sendo que as amostras da unidade de isolamento foram as que apresentaram maior contagem para os micro-organismos mencionados e as da UTI adulto menor contagem microbiana. Para coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus spp* as contagens de micro-organismos das amostras de resíduos das unidades de isolamento e de internação não diferiram entre si, mas tais valores médios diferiram de forma significativa das contagens observadas nas amostras da UTI adulto, que apresentaram menores quantidades. Em pesquisa realizada por Chayb e Kozusny-Andreani [19] nas análises microbiológicas dos resíduos sólidos infectantes obtidos de um hospital escola de Uberlândia/MG, foram encontradas bactérias patogênicas e oportunistas das espécies *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* e fungos como *Candida spp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* e *Rhizopus spp.*, sendo que *E. coli* e *Staphylococcus aureus* apresentaram maior expressão numérica.

Martins et al. [6] realizaram uma pesquisa de isolamento e identificação dos micro-organismos presentes em resíduos de serviço de saúde do município de Santa Fé do Sul/SP e constataram elevadas concentrações de micro-organismos patogênicos, principalmente na área hospitalar, uma vez que, neste ambiente, ocorre um percentual elevado de procedimentos invasivos e clientes susceptíveis a infecções hospitalares. As espécies isoladas foram *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Clostridium tetani*, *Staphylococcus sp*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum* e *Clostridium sp*.

Devido à carga microbiana elevada os resíduos de serviços de saúde requerem tratamento especial durante todo o processo de segregação. Os cuidados

com os resíduos infectantes iniciam-se no descarte, pela separação do material não contaminado, pois os resíduos sólidos que podem causar infecção devem ser submetidos a processos de tratamento em equipamento que promova redução de carga microbiana, para posteriormente serem encaminhados para aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final [3].

Nos processos de tratamento dos RSS objetiva-se a destruição ou inativação irreversível de todos os agentes patogênicos presentes e a prevenção da recuperação ou reinfecção com esses agentes [14,32,35]. Estes procedimentos devem anteceder à deposição final para preservar a saúde pública e ambiental. Estudos realizados por Bassey et al. [72] utilizando procedimentos microbiológicos padrão de detritos sólidos em decomposição, do lixiviado, do solo e do ar, evidenciaram que as bactérias predominantes foram *Escherichia coli*, *Chromobacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* e *Klebsiella spp.* As altas contagens bacterianas associadas a estes achados são indicativas do risco elevado de infecções microbianas.

A fumigação de materiais com gás ozônio pode constituir um sistema antimicrobiano alternativo eficaz, uma vez que é capaz de penetrar em todas as irregularidades superficiais e é aplicável a amplo espectro microbiano [6,36-38]. Devido à sua meia vida curta, sua toxicidade e reatividade, o ozônio deve ser produzido no local, em que reage, principalmente, com ligações duplas carbono-carbono, estruturas aromáticas ativadas e aminas não protonadas. O ozônio reage mais lentamente com ácidos graxos e carboidratos, enquanto reage mais rapidamente com proteínas, aminas, aminoácidos, ácidos nucleicos e grupos funcionais de proteínas [38].

A propriedade bactericida do ozônio foi demonstrada em micro-organismos gram-positivos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), gram-negativos (*Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*) e em esporos [73]. Foram identificados dois mecanismos principais pelos quais o ozônio exerce o efeito bactericida. Um deles é a oxidação de grupos sulfidrílo e aminoácidos de enzimas, peptídeos e proteínas. O outro mecanismo é baseado na oxidação dos ácidos graxos polinsaturados (PUFAs). Nas bactérias gram-negativas os efeitos destrutivos incidem nas camadas de lipoproteína e lipopolissacarídeos, o que contribui para o aumento da permeabilidade das células, que resulta na sua lise. O ozônio atua como um oxidante intracelular geral [47-49].

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi significativamente superior nas amostras de resíduos da unidade de isolamento, sendo essa diferente da contagem observada nas amostras da unidade de internação e nas da UTI adulto. Para *P. aeruginosa* a contagem microbiana foi significativamente inferior nas amostras da unidade de isolamento e significativamente superior nas amostras das unidades de internação e da UTI adulto, sendo que a contagem microbiana das amostras desses dois últimos locais mencionados não diferiu de forma significativa. Comportamento semelhante foi observado na contagem de *Rhizopus spp.*, já que as amostras da unidade de internação apresentaram maior contagem microbiana e as amostras da UTI adulto apresentaram menor contagem para esse micro-organismo, sendo que esse não se diferiu das amostras da unidade de isolamento.

De uma forma geral, de acordo com os dados analisados, a contagem de todos os micro-organismos avaliados foi relativamente superior nas amostras da unidade de isolamento, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhizopus spp.*, que tiveram maior contagem nas amostras da unidade de internação. Na maioria dos casos, as menores contagens microbianas foram observadas nas amostras de resíduos da UTI adulto.

As Figuras 1a, 1b e 1c mostram a distribuição dos intervalos de confiança para a média da quantificação de cada um dos micro-organismos de acordo com as amostras de resíduos coletadas nos locais avaliados.

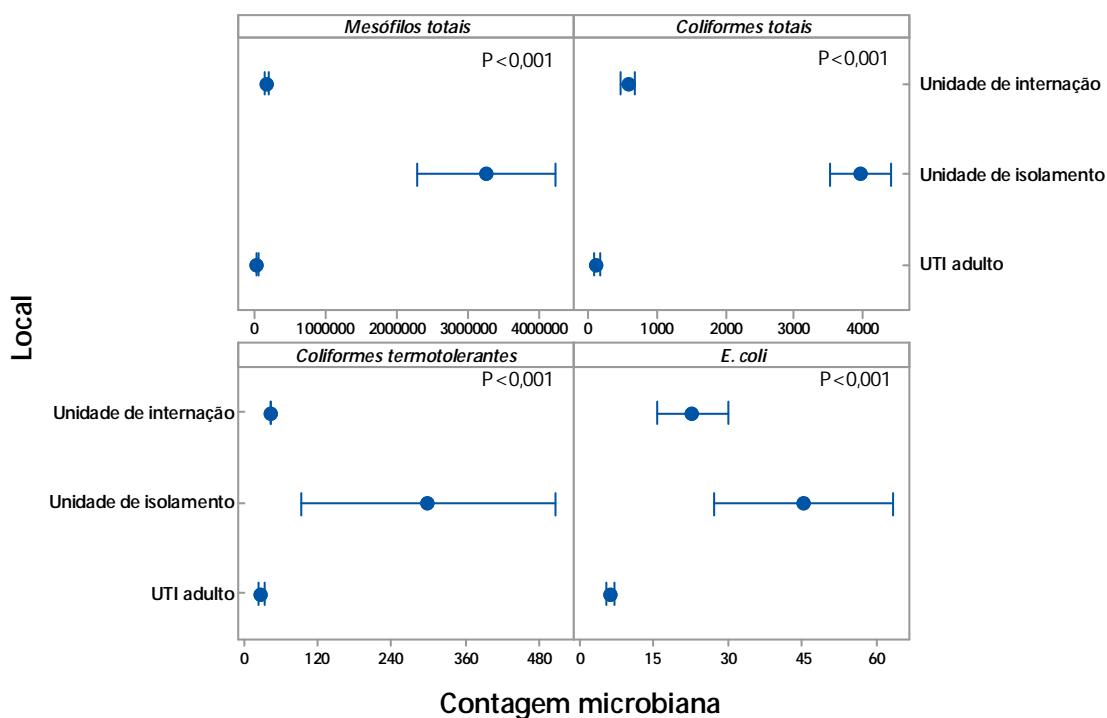


Figura 1a: Distribuição da contagem de mesófilos totais, coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. Coli* de acordo com as amostras dos locais avaliados.

Fonte: Elaborada pela autora.

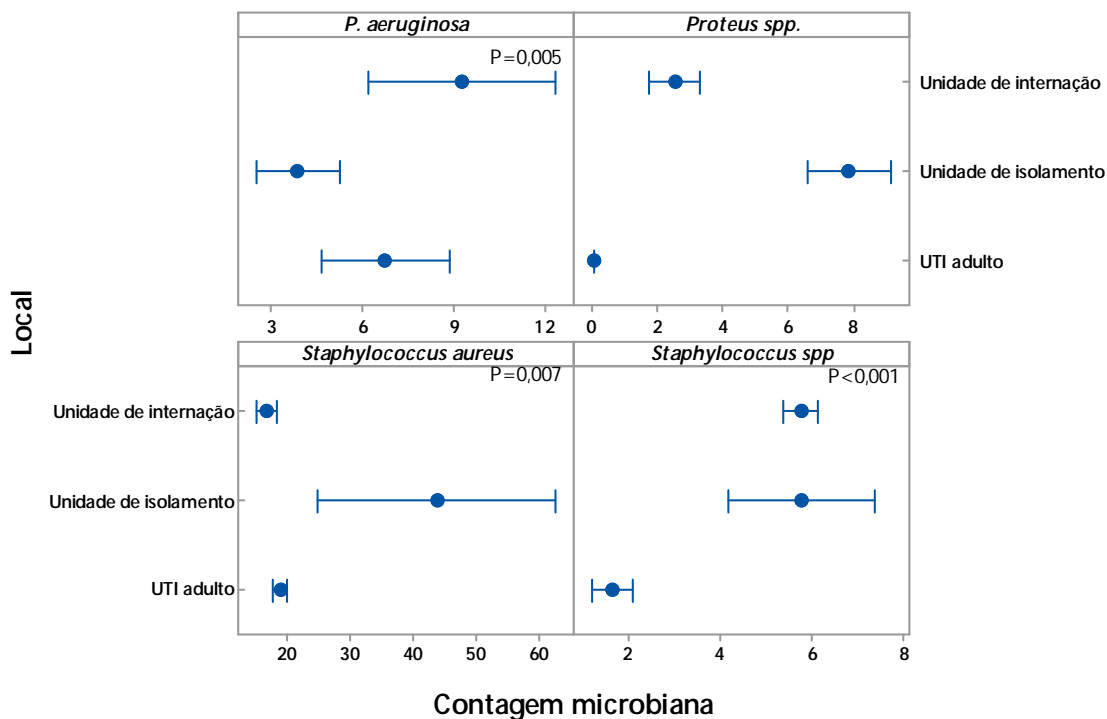


Figura 1b: Distribuição da contagem de *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp* de acordo com as amostras dos locais avaliados.

Fonte: Elaborada pela autora.

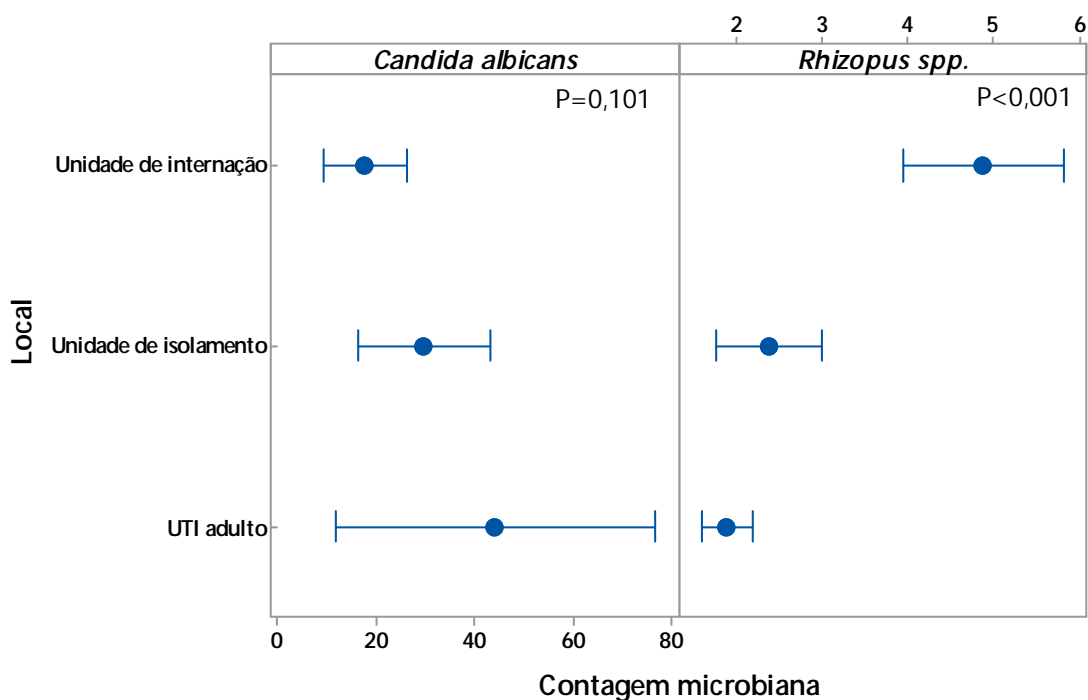


Figura 1c: Distribuição da contagem de *Candida albicans* e *Rhizopus spp.* de acordo com as amostras dos locais avaliados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma evidência estatística que pode ser observada nos gráficos de intervalo de confiança é a não sobreposição para as médias da contagem dos microorganismos avaliados, que reitera a presença de diferenças significativas na comparação da contagem microbiana em relação às amostras dos locais de coleta de resíduos.

3.3. Avaliação da ação do ozônio como desinfetante

A Tabela 2 demonstra os resultados da ação antimicrobiana do ozônio nas amostras de RSS nos três locais de coleta.

Tabela 1: Média \pm desvio padrão da contagem microbiana das amostras de RSS: Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI adulto), Unidade de Internação e Unidade de Isolamento de um hospital particular do Município de Uberlândia, MG, Brasil, de acordo com a ação antimicrobiana do ozônio.

Ação antimicrobiana do ozônio	Doses de ozônio	Local de coleta			Valor P ¹
		UTI adulto	Unidade de internação	Unidade de isolamento	
Sem ozônio	0	2,8.10 ⁴ \pm 1,2.10 ⁴ c	1,7.10 ⁵ \pm 2,1.10 ⁴ b	3,3.10 ⁶ \pm 1,1.10 ⁶ a	<0,001
Ozônio 5 minutos	140 mg. L ⁻¹	8,0.10 ¹ \pm 4,8.10 ¹ b	2,2.10 ³ \pm 9,8.10 ² a	5,6.10 ³ \pm 3,5.10 ³ a	<0,001
Ozônio 10 minutos	180 mg. L ⁻¹	7,0.10 ⁰ \pm 6,0.10 ⁰ c	1,9.10 ¹ \pm 7,9.10 ⁰ b	9,2.10 ¹ \pm 5,4.10 ⁰ a	<0,001
Ozônio 15 minutos	420 mg. L ⁻¹	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,8.10 ⁰ \pm 0,3.10 ⁰	-
Ozônio 20 minutos	560 mg. L ⁻¹	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	-
Ozônio 25 minutos	700 mg. L ⁻¹	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	-

¹ Valor P referente ao teste de Análise de Variância a P<0,05. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de comparação múltipla de Games-Howell a P<0,05. ² Teste de comparação não foi possível de ser realizado devido a um ou mais variáveis apresentaram dispersão nula.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados sugerem a existência de diferenças significativas na contagem microbiana nas amostras dos resíduos sem tratamento e após ozonização, mostrando que as amostras de RSS da unidade de isolamento foram as que apresentaram maiores contagens de micro-organismos, sendo as que apresentaram menor eficiência na desinfecção quando submetidas à ozonização pelos intervalos de tempo pré-determinados para as análises.

O intervalo de tempo de 15 (quinze) minutos de exposição ao ozônio foi suficiente para que as amostras dos locais UTI adulto e unidade de internação apresentassem contagem nula de micro-organismos, resultado que evidenciou a eficácia da ação desse gás como desinfetante nas amostras coletadas nesses locais. Para as amostras da unidade de isolamento foi necessário um intervalo de tempo de 20 (vinte) minutos em contato com o ozônio para que o mesmo efeito ocorresse.

Tormin et al. [59] avaliaram o poder bactericida do ozônio gasoso sobre as bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina e *Pseudomonas aeruginosa*. Observaram que após infusão por 4 (quatro) minutos de ozônio gasoso na concentração de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$ não houve crescimento bacteriano nas leituras de 48h e após 7 dias. Já nas concentrações de $4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $3 \mu\text{g. mL}^{-1}$, constataram crescimento bacteriano, embora em menores quantidades, mostrando ação bactericida parcial. Os autores concluíram que o ozônio tem efeito bactericida sobre bactérias multirresistentes, sendo este efeito proporcional à concentração e ao intervalo de tempo de exposição. Nogales et al. [62] compararam a atividade antimicrobiana de 3 (três) diferentes concentrações de ozônio em *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e constataram que o ozônio aquoso em concentração de $8 \mu\text{g. mL}^{-1}$ foi o mais eficiente para eliminar as três bactérias avaliadas.

Existe possibilidade de variação na sensibilidade dos diferentes micro-organismos quando expostos ao ozônio e fatores ambientais podem afetar a inativação dos mesmos. Em um ensaio *in vitro* conduzido em ágar com patógenos gram-positivos e gram-negativos não foi observada diferença significativa nas contagens de colônias quando foram empregados tratamentos com concentrações de ozônio entre 10 ppm e 50 ppm. Isto porque as células são fisicamente protegidas por

outras na superfície do ágar, isto é, quando as células são espalhadas no meio de cultura, algumas podem não estar presentes como células individuais, mas como grupos que proporcionam proteção física [69].

A Tabela 3 mostra os resultados do percentual de redução da contagem microbiana devido à ação do ozônio nos intervalos de tempo de sua utilização: 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

Tabela 3: Média \pm desvio padrão do percentual de redução da carga microbiana devido à ação do ozônio nas amostras de RSS: Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI adulto), Unidade de Internação e Unidade de Isolamento de um hospital particular do Município de Uberlândia, MG, Brasil.

Redução (%)	Local		
	UTI adulto	Unidade de internação	Unidade de isolamento
Inicial – 5 min	99,5 \pm 0,3	98,7 \pm 0,4	99,7 \pm 0,1
Inicial – 10 min	99,9 \pm 0,0	99,9 \pm 0,0	99,9 \pm 0,0
Inicial – 15 min	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
Inicial – 20 min	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
Inicial – 25 min	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Diante dos resultados da Tabela 3 é possível pressupor que o intervalo de tempo de 15 (quinze) minutos de exposição das amostras dos resíduos ao ozônio foi eficaz na promoção da desinfecção desses materiais. Além disso, é possível observar que nos primeiros cinco minutos de exposição desses materiais ao ozônio, a carga microbiana atinge reduções superiores a 98%. A ação microbicida do ozônio foi verificada por Martinelli et al. [36]. Esses autores investigaram a eficácia do tratamento do ozônio (aquoso e gasoso) como uma tecnologia sanitizante alternativa aos desinfetantes convencionais comuns na redução da contaminação microbiana da água e do ar. Os tratamentos com ozônio aquoso e gasoso foram eficazes contra contaminantes microbianos, reduzindo as unidades formadoras de colônias dos microorganismos *E. coli* (26,4% de redução), *P. aeruginosa* (57,4%), *S. aureus* (98,9%), *Streptococcus faecalis* (64,2%) e *Legionella pneumophila* (87,5%), constituindo-se em

uma alternativa de tratamento antimicrobiano extremamente promissora, permitindo a possibilidade de reutilização de água contaminada.

As Figuras 2 e 3 mostram o comportamento da carga microbiana das amostras de resíduos coletadas nos três locais de estudo, simultaneamente, ao longo dos intervalos de tempo de exposição ao ozônio.

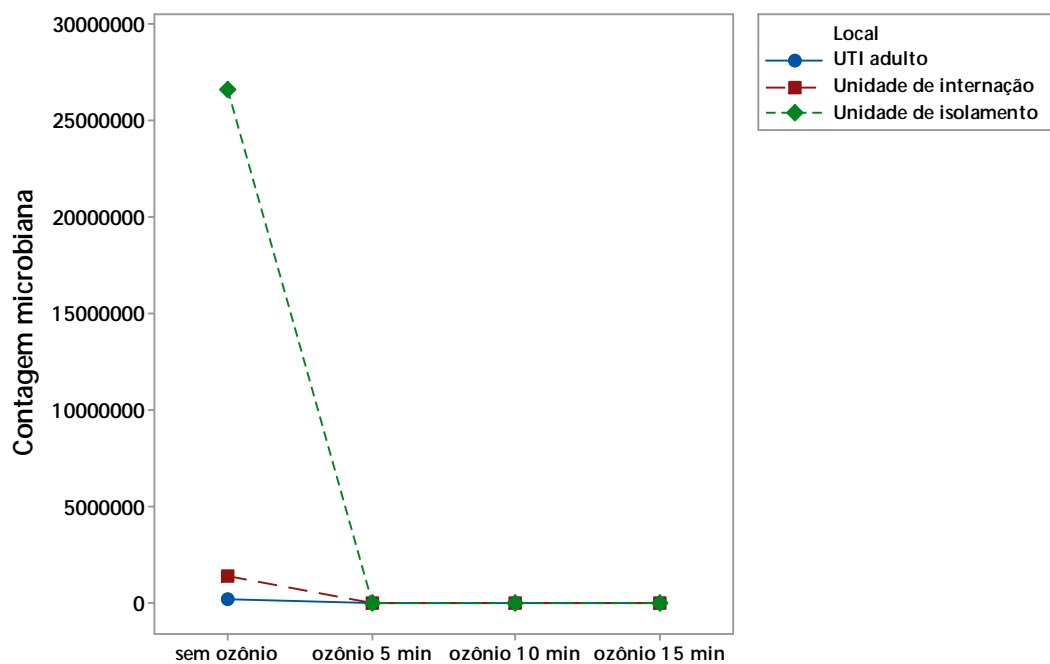


Figura 2: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS dos três locais avaliados no estudo sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.

Fonte: Elaborada pela autora.

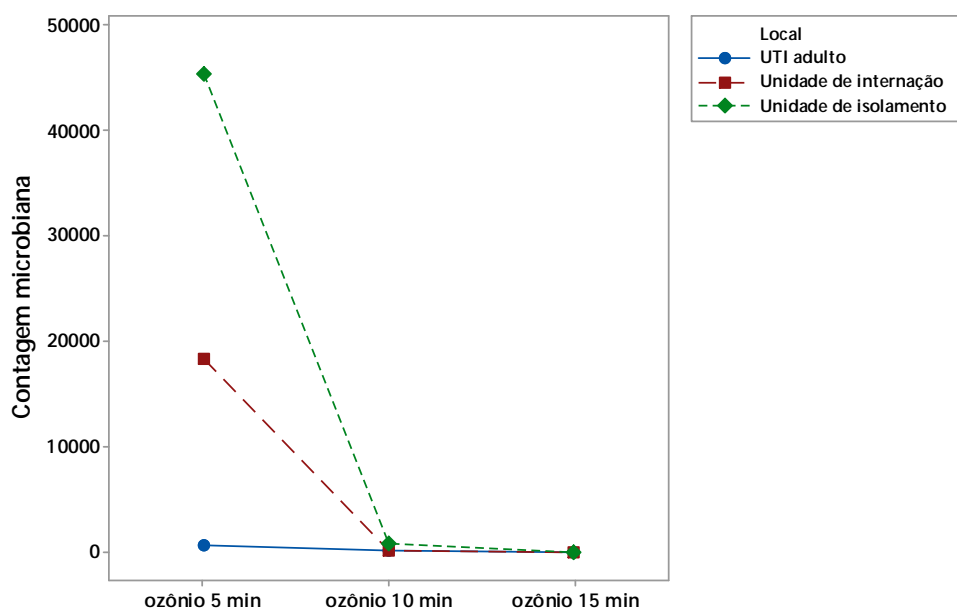


Figura 3: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio referente às amostras de RSS dos três locais avaliados no estudo (excluindo a contagem inicial).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados observados nas Figura 2 e 3 mostram a elevada contagem de micro-organismos nas amostras de resíduos de serviços de saúde da unidade de isolamento, seguida das amostras da unidade de internação e das amostras da UTI adulto. Os resultados indicam que a contagem microbiana é nula a partir de 15 (quinze) minutos de exposição ao gás ozônio para as amostras da UTI adulto e para as amostras coletadas da unidade de internação, sendo considerada praticamente nula nesse intervalo de tempo para as amostras da unidade de isolamento.

As Figuras de 4 a 9 permitem a visualização da contagem microbiana em função dos intervalos de tempo de exposição das amostras de resíduos ao ozônio, em gráficos, separados por locais de coleta, conforme legendas.

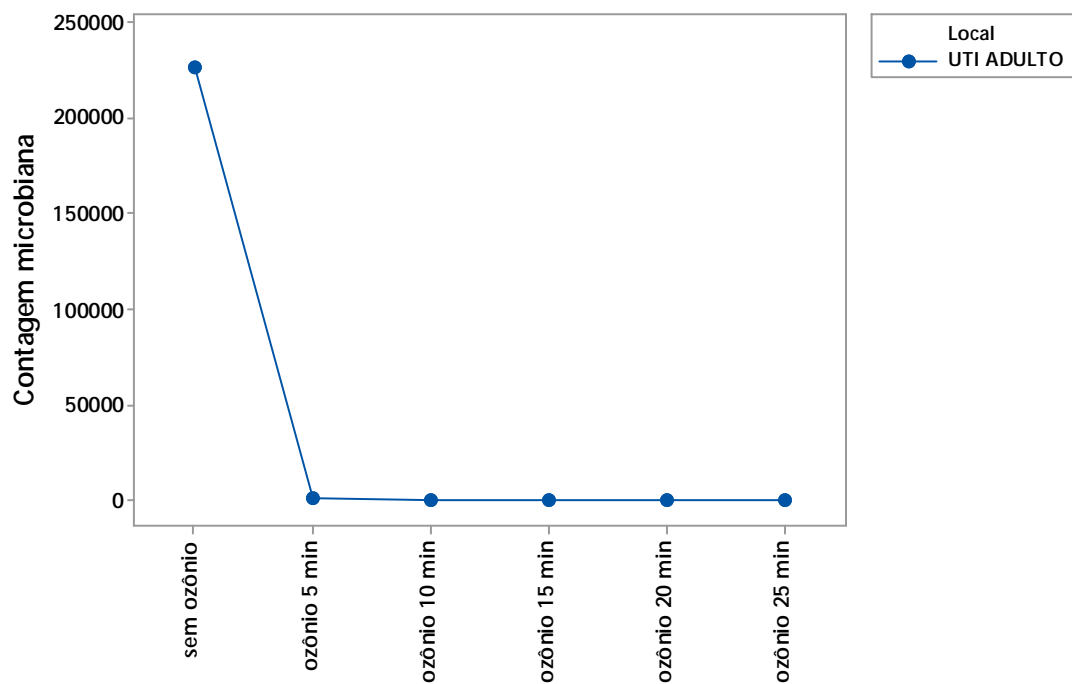


Figura 4: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS da UTI adulto sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.

Fonte: Elaborada pela autora.

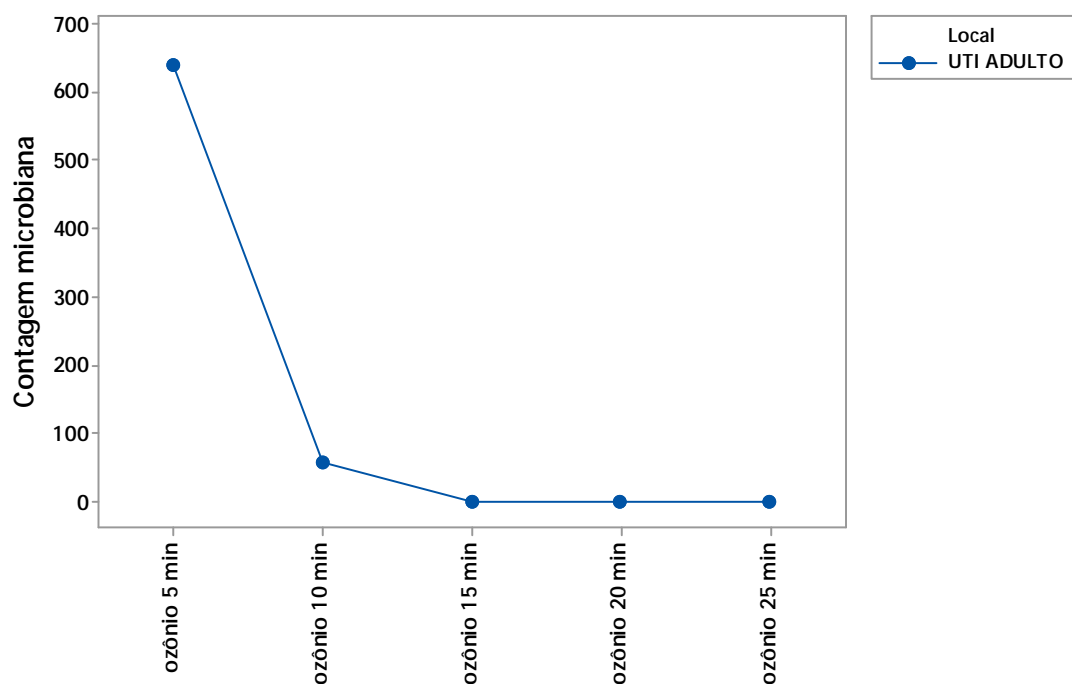


Figura 5: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio das amostras de RSS da UTI adulto (excluindo a contagem inicial).

Fonte: Elaborada pela autora

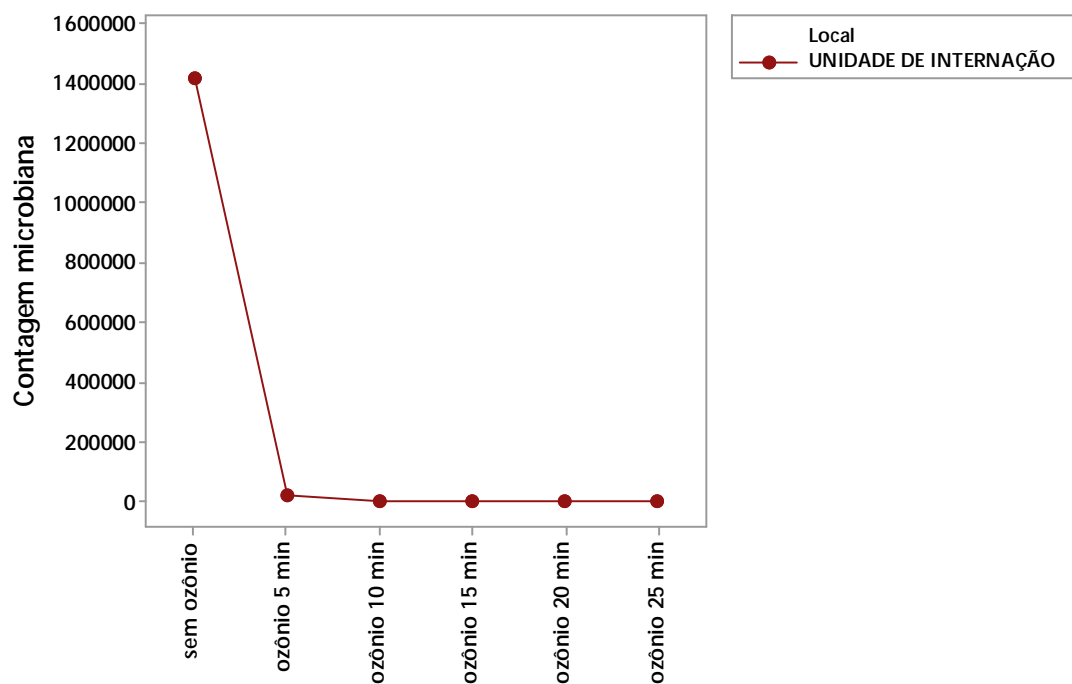


Figura 6: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS da unidade de internação sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.

Fonte: Elaborada pela autora.

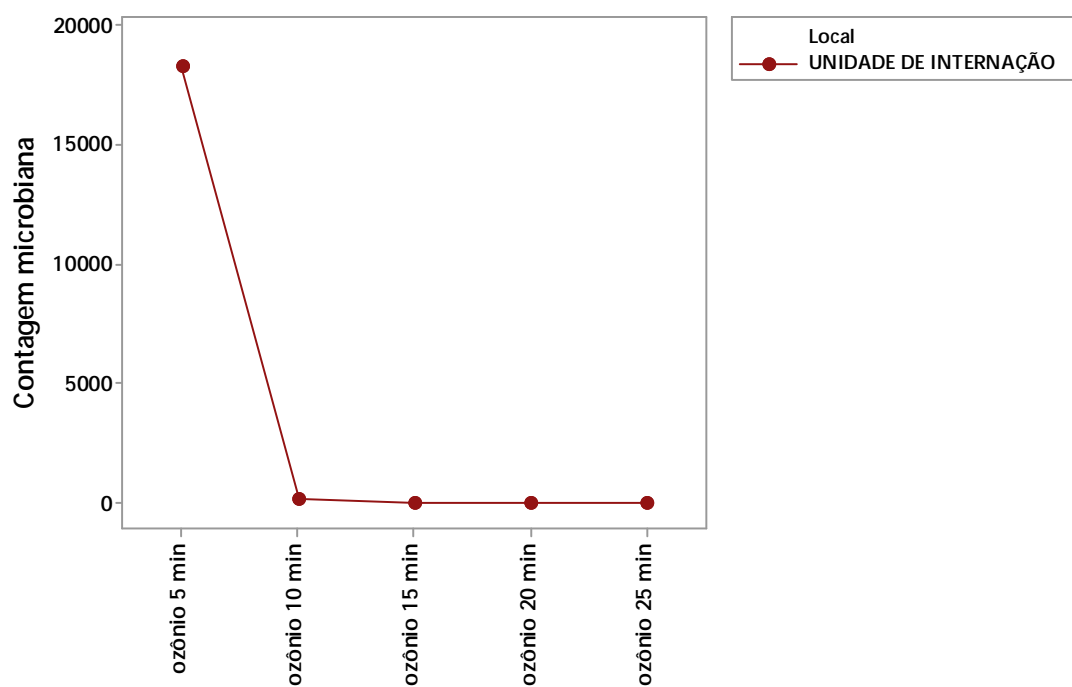


Figura 7: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio das amostras de RSS da unidade de internação (excluindo a contagem inicial).

Fonte: Elaborada pela autora.

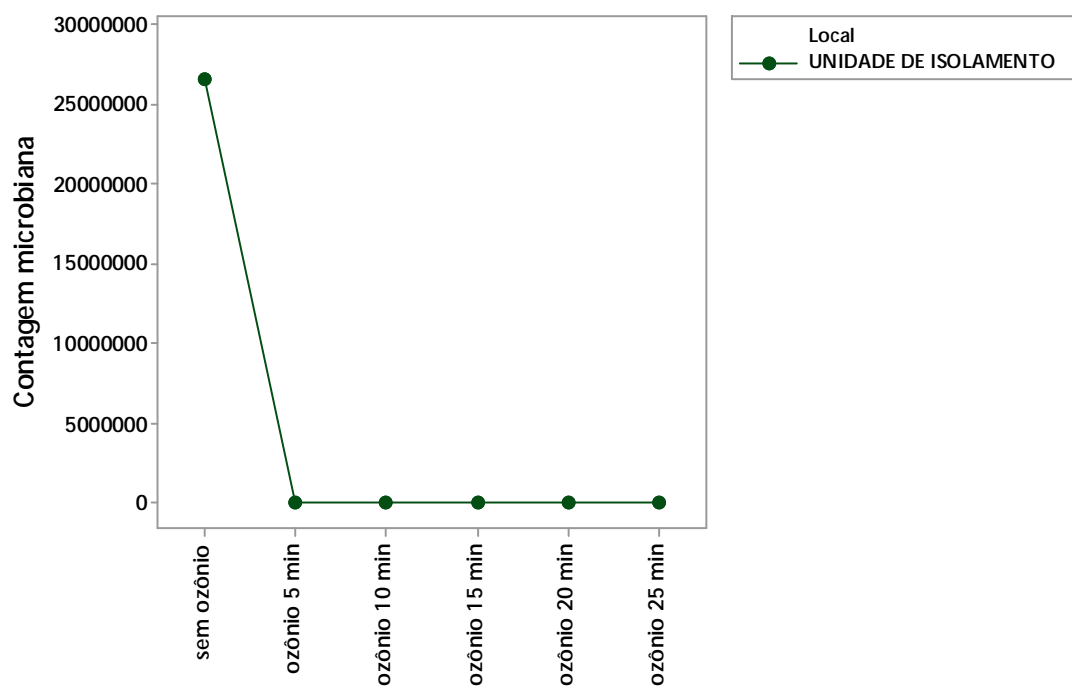


Figura 8: Gráfico de linha da carga microbiana das amostras de RSS da unidade de isolamento sem tratamento e sua variação em função do tempo após ozonização.

Fonte: Elaborada pela autora.

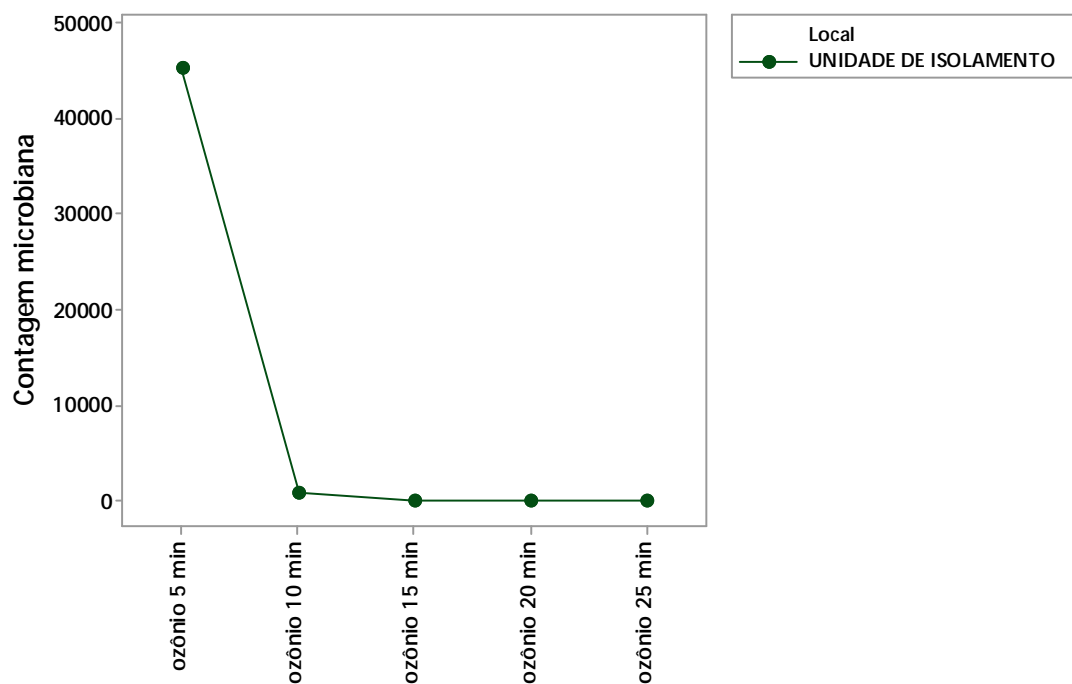


Figura 9: Gráfico de linha da variação da carga microbiana em função do tempo de tratamento com ozônio das amostras de RSS da unidade de isolamento (excluindo a contagem inicial).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4. Avaliação do custo benefício de tecnologias de tratamento de resíduos de serviços de saúde

Nos últimos anos, ambientalistas e agências de políticas públicas têm procurado definir tecnologias de esterilização adequadas para os RSS, para assegurar a possibilidade de reciclagem e a reutilização de alguns materiais. Neste contexto, o tratamento com uma autoclave a vapor está recebendo considerável atenção como uma possível alternativa à incineração, bem como o desenvolvimento sustentável da gestão, pois favorece a logística reversa a partir de resíduos esterilizados [17,29,32].

Em vista a avaliar os custos de investimento e de funcionamento de diferentes tecnologias de desinfecção para tratamento de 10.000 kg de resíduos por dia, Ökten et al. [29] realizaram um estudo comparando as tecnologias de autoclave, de conversão e de ozonização. Em todos os sistemas o investimento inicial tinha custo fixo definido. Os custos operacionais foram as variáveis de energia elétrica, bem como de consumo de água e gás natural. O consumo de água da autoclave, devido à esterilização a vapor, foi significativamente maior do que nas outras tecnologias; na ozonização o consumo foi mínimo e as águas residuais não foram produzidas no final do tratamento. A capacidade de tratamento da tecnologia de ozonização foi maior do que nas tecnologias de conversão e autoclave. Seriam necessárias 20 h com o conversor 5000H, 12,5 h com o ozonizador NG1000 e, aproximadamente, 26 h com a autoclave 3648144 para tratar 10.000 kg de resíduos de serviços de saúde. Os custos mensais foram menores com a ozonização, 925,6 dólares, enquanto que com o conversor e autoclave foram de 12.036 e 9.418,24 dólares, respectivamente.

A técnica de descontaminação por ozonização foi a opção economicamente mais vantajosa entre as comparadas. Ela é eficiente na eliminação de micro-organismos, possibilita aos geradores de resíduos médicos a implantação do sistema no local e ainda permite que os resíduos sejam transferidos com segurança para a área de aterro sanitário [29].

As vantagens da ozonização apresentadas e a eficácia antimicrobiana comprovadas evidenciam a possibilidade da sua utilização no controle de bactérias

patogênicas na área da saúde, na descontaminação de ambientes, de resíduos, de efluentes, de instrumentais, entre outros.

4. CONCLUSÕES

Conforme a metodologia utilizada e os resultados obtidos por meio da pesquisa, pode-se concluir que:

- os resíduos de serviços de saúde apresentaram alta carga microbiana constituída por mesófilos totais, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, leveduras da espécie *Candida albicans* e bolores identificados como *Rhizopus spp.*;
- o gás ozônio, na concentração de de 560 mg. L⁻¹, foi eficiente na eliminação total dos micro-organismos encontrados nas amostras de resíduos de serviços de saúde estudadas, em exposição por 20 minutos;
- a carga microbiana atingiu reduções superiores a 98% nos primeiros cinco minutos de exposição das amostras ao ozônio, na dose de 140 mg. L⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
02. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. RDC n.306 de 07 dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília (2004 dez. 10).
03. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília (2005 maio 29).
04. Martins CC. Eficácia do ozônio no controle de micro-organismos isolados em resíduos de serviços de saúde. Dissertação (Mestrado). Fernandópolis: Universidade Camilo Castelo Branco; 2013. 107 p.
05. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2014. 12a. ed. São Paulo: ABRELPE; 2014. 120 p.
06. Martins CC, Kozusny-Andreani DI, Mendes ECB. Ozônio no controle de micro-organismos em resíduos de serviços de saúde. Rev Baiana Enferm. 2015; 29(4):318-327. doi: <http://dx.doi.org/10.18471/rbe.v29i4.13678>.
07. Silva SB, Luvielmo MM, Geyer MC, Prá I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. Semina Cienc Agrar. 2011; 32(2):659-682. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n2p659.
08. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 10004: resíduos sólidos. Rio de Janeiro: ABNT; 2004. 71 p.
09. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2015. 13a. ed. São Paulo: ABRELPE; 2015. 92 p.
10. Mendes AA, Cintrão JFF. Os resíduos de serviços de saúde e a questão ambiental. Rev Uniara. 2004; 15:121-134.
11. Singh P. Impact of Solid Waste on Human Health: A Case Study of Varanasi City. International J Scientific & Engineering Research. 2013; 4(11):1840-1842.
12. Saini S, Das KB, Kapil A, Nagargan S, Sarma RK. The study of bacterial flora of different types in hospital waste: Evaluation of waste treatment at aims hospital, New Delhi. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004; 35: 986-989.

13. Blenkarn JI. Safe disposal and effective destruction of clinical wastes. *J. Hosp Infect.* 2005; 60:295-297.
14. Alagöz A.Z, Kocasoy G. Determination of the best appropriate management methods for the health-care wastes in İstanbul. *Waste Manag.* 2008; 28:1227-1235.
15. Traversi D, Alessandria L, Schilirò T, Gilli G. Size-fractionated PM10 monitoring in relation to the contribution of endotoxins in different polluted areas. *Atmospheric Environment.* 2011; 45:3515-3521.
16. Kaźmierczuk M, Bojanowicz-Bablok A. Bioaerosol concentration in the air surrounding municipal solid waste landfill. *Environm Prot Nat Resourc.* 2014; 25:17-25. doi: 10.2478/oszn-2014-0015.
17. Hamer G. Solid waste treatment and disposal: effects on public health and environmental safety. *Biotech Adv.* 2003; 22:71-79.
18. Bidone FA, (coord.) Resíduos sólidos provenientes de coletas especiais: eliminação e valorização. Brasília: FINEP/PROSAB; 2001. Capítulo 4, Experiências em Eliminação de Resíduos Sólidos; 135-205.
19. Chayb EF, Kozusny-Andreani DI. Estudo comparativo da contaminação por micro-organismos patogênicos em resíduos domiciliares e de saúde em Uberlândia (MG). *Rev Bras Ciênc Amb.* 2015; 37:72-87. doi: 10.5327/Z2176-9478201512414.
20. Black JG. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas.* 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 856 p.
21. Pinheiro P. Diarreia pela bactéria *Escherichia Coli* (E.coli) [Internet]. [Local desconhecido]; 2016. Disponível em: <http://www.mdsaude.com/2011/06/bacteria-escherichia-coli.html> (acessado em 22 fev 2017).
22. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia.* 10a ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. 967 p.
23. Friedrich M. *Pseudomonas aeruginosa* infections [Internet]. [Local desconhecido]; 2016. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview> (acessado em 22 fev 2017).
24. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Brasília: Ministério da Saúde; [data desconhecida]. 64 p.
25. Gompertz OF, Gambale WP, Paula CR. *Biologia dos Fungos.* In: Trabulsi LR, Alterthum F (eds). *Microbiologia.* 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 451-459.

26. Levinson W, Jawetz E. *Microbiologia médica e imunologia*. 7a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 632 p.
27. Ananth AP, Prashanthini V, Visvanathan C. Healthcare waste management in Asia. *Waste Manag*. 2010; 30:154-161.
28. Gautam V, Thapar R, Sharma M. Biomedical waste management: Incineration vs. environmental safety. *Indian J Med Microbiol*. 2010; 28: 191-192.
29. Ökten HE, Corum A, Demir HH. A comparative economic analysis for medical waste treatment options. *Environm. Prot. Eng*. 2015; 41(3):137-145. doi: 10.5277/epe150310.
30. Mattiello, A, Chiodini P, Bianco, E, Forgione, N, Flammia, I, Gallo C, Pizzuti R, Panico S. Health effects associated with the disposal of solid waste in landfills and incinerators in populations living in surrounding areas: A systematic review. *Int J Public Health*. 2013; 58:725-735.
31. Ashworth DC, Elliott P, Toledano MB. Waste incineration and adverse birth and neonatal outcomes: a systematic review. *Environ Int*. 2014; 69:120-132.
32. Oliveira EA, Nogueira NGP, Innocentini MDM, Pisani RJr. Microwave inactivation of *Bacillus atrophies*' spores in healthcare waste. *Waste Manag*. 2010; 30:2327–2335.
33. Hossain S, Balakrishnan N, Ab Rahman NNN, Sarker ZI, Ab Kadir MO. Treatment of Clinical Solid Waste Using a Steam Autoclave as a Possible Alternative Technology to Incineration. *Int J Environ Res Public Health*. 2012; 9:855-867. doi:10.3390/ijerph9030855.
34. Instituto Brasileiro de Administração Municipal. Manual gerenciamento integrado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro: IBAM; 2001. 204 p.
35. Zhang J, Dalal N, Matthews MA, Waller LN, Saunders C, Fox KF, Fox A. Supercritical carbon dioxide and hydrogen peroxide cause mild changes in spore structures associated with high killing rate of *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods*. 2007; 70:442-451.
36. Martinelli, M, Giovannangeli F, Rotunno S, Trombetta CM, Montomoli E. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *J Prev Med Hyg*. 2017; 58:E48-E52.
37. Sharma M, Hudson JB. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect. Control*. 2008; 36:559-63.
38. Rosenblum J, GE C, Bohrerova Z, Yousef A, Lee J. Ozonation as a clean technology for fresh produce industry and environment: sanitizer efficiency and wastewater quality. *J App Microbiol*. 2012; 113(4):837-845. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05393.x.

39. Lenzi E, Favero LOB. Introdução a química da atmosfera: ciência, vida e sobrevivência. Rio de Janeiro: LTC; 2011. Capítulo 10, O ozônio na atmosfera; p. 221-246.
40. Lapolli FR, Santos LF, Hassemer MEN, Aisse MM, Piveli RP. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: Gonçalves RF. (coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica. Vitória: PROSAB; 2003. p. 169-208.
41. Langlais B, Rockhow DA, Brink DR. Ozone in Water Treatment: Application and Engineering. Chelsea: Lewis Publishers; 1991. Capítulo 3, Practical Application of Ozone: Principles and Case Study; p. 133-316.
42. DuRon B. Ozone Generation with Ultraviolet Radiation. In: Rice RG, Netzer A. Handbook of Ozone Technology and Applications. Ann Arbor: Ann Arbor Science; 1982. p. 78-102.
43. Passos TM. Análise comparativa do efeito do ultrassom e ozônio na eliminação de cistos de giardia ssp provenientes de amostras de esgoto. Dissertação (Mestrado). São José dos Campos: Universidade Camilo Castelo Branco; 2013. 56 p.
44. Chiag HK, Floyd HY. Mass Transfer of Ozone into Aqueous Systems. In: Rice RG, Netzer A. Handbook of Ozone Technology and Applications. Ann Arbor: Ann Arbor Science; 1982. p. 105-141.
45. Dezotti, M (coord.). Processos e Técnicas para o Controle Ambiental de Efluentes Líquidos. Rio de Janeiro: E-papers; 2008. 360 p.
46. Guzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry. *Lebenson Wiss Technol.* 2004; 37(4):453-460. doi: 10.1016/j.lwt.2003.10.014.
47. Khadre MA, Yousef AE, Kim J-G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *J Food Sci.* 2001; 66(9):1242-1252. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x.
48. Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T, Poonkhum R, Srisukonth C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Appl Microbiol.* 2002; 48:193-199.
49. Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J Antimicrob. Chemother.* 2003; 52:750-763.
50. Murray BK, Ohmine S, Tomer DP, Jensen KJ, Johnson FB, Kirsi JJ. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J Virol Methods.* 2008; 153:74-77.

51. Ramos EL, Kozusny-Andreani DI, Fernandes AU. Avaliação da ação do ozônio no processo de lavagem de leitos hospitalares veterinários de pequenos animais. In: Anais do Encontro de Pós-graduação e Iniciação Científica; 2013 7 e 8 de jun; Fernandópolis, SP. Fernandópolis: UNICASTELO; 2013. 1:220-222.
52. Garcia CA, Stanziola L, Vieira IS, Naves, JHFF, Neves SMN. O gás ozônio na descontaminação de ambientes cirúrgicos. Vet. Not. 2008; 14(2):37-40.
53. Zângaro RA, Fernandes AB, Lima CJ. Ozônio - Fundamentos e Aplicações. In: Andrade AO, Soares AB, Cardoso A, Lamounier EA. Tecnologias, técnicas e tendências em engenharia biomédica. 1a ed. Uberlândia: Canal 6; 2014. p. 94-113.
54. Passos TM, Silva LHM, Alves LP, Zângaro RA, Lima CJ, Fernandes AB. Avaliação do efeito do ozônio na eliminação de micro-organismos provenientes de amostras de esgoto. In: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica; 2014 13-17 out; Uberlândia, MG. Rio de Janeiro: SBEB; 2014:724-727.
55. Velano HE, Nascimento LC, Barros LM, Panzeri H. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. Pesqui Odontol Bras. 2001;15(1):18-22. doi: 10.1590/S1517-74912001000100004.
56. Cardoso CC, Veiga SMOM, Nascimento LC, Fiorini JE, Amaral LA. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. Ciênc Tecnol Aliment. 2003; 23(1):59-61.
57. Canada, MLM. Eficiência da água ozonizada no reprocessamento de dialisadores sanguíneos. Dissertação (Mestrado). São José dos Campos: Universidade Camilo Castelo Branco; 2013. 58 p.
58. Pereira MMS, Navarini A, Mimica LMJ, Pacheco Jr AM, Silva RA. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano. Estudo experimental "*in vitro*". Rev Col Bras Cir. 2005; 32(1):12-14. doi: 10.1590/S0100-69912005000100004.
59. Tormin SC, Navarini A, Almeida JOCF, Travassos LHR, Negri MVG, Silva RA. Análise do efeito bactericida do ozônio sobre bactérias multirresistentes. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 2016; 61:138-141.
60. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. Braz Dent J. 2006; 17(2):134-138. doi: S0103-64402006000200010 [pii].
61. Fontes B, Heimbecker AMC, Brito GS, Costa SF, Van der Heijden IM, Levin AS, Rasslan S. Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. BMC Infect Dis. 2012; 12(1):358. doi: 10.1186/1471-2334-12-358. Conferir as páginas.
62. Nogales CG, Ferreira MB, Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* – *in vitro* study. Revista Española de Ozonoterapia. 2014; 4(1):9-15.

63. Santos RR, Faroni LRD, Cecon PR, Ferreira APS, Pereira OL. Ozone as fungicide in rice grains. *Rev Bras Eng Agric Ambiente*. 2016; 20(3):230-235. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n3p230-235>.
64. Rodrigues VO, Costa FR, Nery MC, Cruz SM, Melo SGF, Caralho LMN. Treating sunflower seeds subjected to ozonization. *J. Seed Sci*. 2015; 37(3):202-210. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v37n3148582>.
65. Pinto AT, Raimundo SA, Raihmer F. Uso de ozônio no controle de fungos em sala de maturação de queijos. *Acta Sci Vet*. 2007; 35:333-337.
66. Cavalcante DA, Leite Júnior BRDC, Tribst AAL, Cristianini M. Uso de ozônio gasoso na sanitização de câmaras frigoríficas. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*. 2014; 69(2):121-128. doi: 10.14295/2238-6416.v69i2.280.
67. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.
68. Winn Junior W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760 p.
69. Wani S, Maker JK, Thompson JR, Barnes J, Singleton I. Effect of Ozone Treatment on Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria sp.* on Spinach. *Agriculture*. 2015; 5:155-169. doi:10.3390/agriculture5020155.
70. ZAR JH. Biostatistical Analysis. 5th ed. Essex: Prentice Hall; 2009. 960 p.
71. Park H, Lee H, Kim M, Lee J, Seong S-Y, Ko G. Detection and hazard assessment of pathogenic microorganisms in medical waste. *J Environ Sci. Health part: A*. 2009; 44:995-1003.
72. Basseyy IU, Brooks AA, Asikong BE, Andy IE. Environmental and Public Health Aspects of Solid Waste Management at the Lemna Dumpsite in Calabar, Cross River State, Nigeria. *Int J Trop Dis Health*. 2015; 10(3):1-13.
73. Guizel-Seydim Z, Bever PIJR, Greene AK. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiol*. 2004; 21:475-479