

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

VERA LÚCIA TABA SUMIDA

**O USO DO GÁS OZÔNIO E BAIXA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO DE
Staphylococcus aureus EM AGULHAS DE SUTURA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, Novembro/2021

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

VERA LÚCIA TABA SUMIDA

**O USO DO GÁS OZÔNIO E BAIXA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO DE
Staphylococcus aureus EM AGULHAS DE SUTURA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador Prof. Dr. Antonio Guillermo Jose Balbin
Villaverde

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes
Moretti

Coorientador: Prof. Dr. Carlos José de Lima

São José dos Campos, Novembro/2021

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

VERA LÚCIA TABA SUMIDA

**O USO DO GÁS OZÔNIO E BAIXA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO DE
Staphylococcus aureus EM AGULHAS DE SUTURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica
aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde
Orientador
Mestrado em Engenharia Biomédica
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Alvaro José Damião
Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA)

Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Carlos José de Lima
Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, Novembro/2021

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

VERA LÚCIA TABA SUMIDA

Graduada em Estética e Cosmética pela Universidade Anhembi Morumbi, Pós-graduada em Docência para o Ensino Superior, Pós-graduada em Cosmetologia Aplicada à Estética, Mestranda em Engenharia Biomédica pela Universidade Anhembi Morumbi. Docente do Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmética da Faculdade EBRAMEC.

Ficha Catalográfica

T11	<p>Taba, Vera Lucia O uso de gás ozônio e baixa pressão na inatividade de <i>Staphylococcus aureus</i> em agulhas de sutura / Vera Lucia Taba. – 2021. 59f.: il.; 30 cm.</p> <p>Orientador: Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2021. Bibliografia: f.56-59.</p> <p>1. Engenharia Biomédica. 2. Gás Ozônio. 3. Baixa Pressão. 4. <i>Staphylococcus aureus</i>. 5. Agulhas de Sutura. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 616.075</p>
-----	---

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus pais que me deram uma família linda, que construíram uma base forte, sempre mostraram o caminho para que nunca desistisse dos sonhos e ideais, por nunca deixarem de acreditar e pelo apoio em todas as horas. A meus queridos irmãos, que são meus melhores amigos.

Dedico também ao meu filho Caio e a meu marido Auro pelo apoio e incentivo mesmo nas horas mais difíceis e desafiadoras, que não foram poucas e que, por diversas vezes, nos colocaram à prova, mas ainda assim conseguimos manter a união, serenidade, nos apoiar e superar as barreiras juntos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por trazer a serenidade e sanidade, tão necessárias em tempos tão desafiadores e por todos os insights noturnos, de onde vieram inspiração e respostas para diversas dúvidas da pesquisa.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde por todos os ensinamentos e, principalmente, pela maneira educada, calma e serena com que me auxiliou e acompanhou durante toda a pesquisa.

Agradeço aos meus co-orientadores Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti e Prof. Dr. Carlos José de Lima, pela paciência, comprometimento e todo o conhecimento compartilhado, além do acompanhamento em toda a etapa de desenvolvimento e aplicação do protocolo experimental.

Gostaria de expressar minha gratidão ao colega Henrique Carvalho pelo suporte nos laboratórios do CITÉ e pelo comprometimento em todos os ensaios do protocolo experimental. Agradeço também aos colegas Maycon e Túlia, pelo suporte nos últimos experimentos.

Gratidão às minhas amigas queridas: Leila Poggetto, Irinéia Bacelar, Ana Cristina, Cláudia, Verônica, Agnes e todos os demais colegas de curso, que tornaram os momentos tensos e todas as incertezas lá do início em momentos alegres e de incentivo mútuos. Foram fundamentais nessa caminhada.

Agradeço também ao coordenador Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro pela organização do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Minha gratidão a todos os professores pelo sólido conhecimento e experiências compartilhadas, que engrandecem e enriquecem o PPG em Engenharia Biomédica.

Muito grata à Nídia Macedo, que sempre demonstrou sua simpatia, respeito, atenção, eficiência e agilidade em responder e atender às dúvidas e solicitações.

Especial agradecimentos a todos os autores referenciados neste trabalho por sua contribuição à pesquisa e por enriquecer esta dissertação.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de Mestrado, sendo que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A agulha de sutura é considerada um artigo crítico, utilizado em procedimentos de alto risco, penetra tecidos ou órgãos, requer, portanto, a esterilização para uso. Os métodos de esterilização de materiais cirúrgicos mais usuais são Autoclave, Radiação Gama e Óxido de Etileno (EtO). A necessidade de processos a baixa temperatura trouxe o óxido de etileno como alternativa eficaz pela grande compatibilidade com a maioria dos materiais, mas apresenta alta toxicidade. A radiação gama não apresenta nenhum dos problemas toxicológicos do EtO, é considerada padrão-ouro, tendo como vantagem efetuar a esterilização já na embalagem final hermeticamente selada, entretanto é mais dispendiosa do que outros métodos de esterilização. Tal demanda exige formas alternativas de esterilização destes materiais, como o gás ozônio que é uma substância natural, facilmente gerada *in situ*, por um gerador de ozônio, a partir de oxigênio medicinal, sendo capaz de inativar os microrganismos através da oxidação de componentes celulares vitais. O microrganismo utilizado para a contaminação das agulhas foi o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), bactéria Gram-positiva, unicelular, cujo citoplasma é composto de 70% de água. Devido a essa característica bacteriana, a Baixa Pressão foi avaliada com o intuito de promover a vaporização da água a baixa pressão, que ocorre com o decaimento da pressão para valores inferiores à pressão máxima de vapor (saturação), que na temperatura de teste, 20°C, é de 2,3 kPa (17,53 mmHg). O estudo proposto, tem como objetivo avaliar a eficácia da Baixa Pressão, do Gás Ozônio e sua associação na inativação de *S. aureus* em agulhas de sutura contaminadas experimentalmente. A amostra foi dividida em 6 grupos com 10 agulhas de sutura cada. Grupo 1: Controle Negativo, (agulhas estéreis). Grupo 2: Controle Positivo C+. Os grupos 3 a 6 foram submetidos à Baixa Pressão e/ou Gás Ozônio (O_{3(g)}) dentro de uma câmara de vidro vedada de 10 L. Grupo 3: Baixa Pressão (BP) por 30 min; Grupo 4: BP por 30 min e O_{3(g)} por 30 min, Grupo 5: BP por 30 min e O_{3(g)} por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio e Grupo 6: O_{3(g)} por 60 min, sendo 30 min de ozonização, seguido de 30 min de exposição ao ozônio. Foi utilizada a dose de 60 mg/cm² de O_{3(g)} no Grupo 4 e 120 mg/cm² de O₃ nos Grupos 5 e 6. A redução da carga de *S. aureus* no Grupo 3 foi de 33,2% em relação ao C+ (p<0,05). Nos Grupos 4 e 5 a redução foi de 100% (p<0,001), já para o Grupo 6 foi de 99,2% (p<0,001). A inovação deste trabalho foi avaliar a Baixa Pressão como alternativa microbicida. Nos parâmetros do estudo foi comprovada a eficácia da aplicação do Gás Ozônio e de sua associação com a Baixa Pressão na inativação de *S. aureus*. O protocolo experimental é promissor para esterilização e será testado em outros microrganismos, como: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Mycobacterium massiliense*.

Palavras-chave: Engenharia Biomédica. Gás Ozônio. Baixa Pressão. *Staphylococcus aureus*. Agulhas de Sutura.

THE USE OF OZONE GAS AND LOW PRESSURE IN THE INACTIVATION OF *Staphylococcus aureus* IN SUTURE NEEDLES

ABSTRACT

The suture needle is considered a critical item because it is used in high-risk procedures, in which it penetrates tissues or organs, therefore, it requires sterilization for use. The most common methods of sterilization of surgical materials are Autoclave, Gamma Radiation and Ethylene Oxide (EtO). The need for low temperature processes brought ethylene oxide as an effective alternative due to its great compatibility with most materials, but it has high toxicity. Gamma radiation does not present any of the toxicological problems of EtO, it is considered the gold standard and has the advantage of performing the sterilization in the final hermetically sealed package, however it is more expensive than other sterilization methods. This demand requires alternative forms of sterilization of surgical materials, such as ozone, which is a natural substance, easily generated *in situ* from oxygen through a polarized reactor with high electrical voltage, capable of activating microorganisms through oxidation of vital cellular components. The microorganism used in the study was *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a Gram-positive, unicellular bacteria whose cytoplasm is composed of 70% water. Due to this characteristic, Low Pressure (LP) appears in one of the experimental groups, since the vaporization of water at low pressure occurs as the vapor pressure drops below the saturation pressure (2.3 kPa at 20°C). The proposed study aims to evaluate the effectiveness of LP, O_{3(g)} and both of them to inactivate *S. aureus* in experimentally contaminated suture needle. The sample was divided into 6 groups with 10 suture needle per each. Group 1: Negative Control was composed of sterile needles. Group 2: Positive Control C+, Group 3: Low Pressure (LP) for 30 min; Group 4: LP for 30 min and O_{3(g)} for 30 min, Group 5: LP for 30 min and O_{3(g)} for 60 min, with 30 min of ozonation and an additional 30 min of exposure to ozone, and Group 6: O_{3(g)} for 60 min, with 30 min of ozonation and an additional 30 min of exposure to ozone. Groups 3 to 6 were submitted to LP and/or O_{3(g)} inside a 10 L glass chamber. A dose of 60 mg/cm² of O_{3(g)} was used in Group 4 and 120 mg/cm² of O_{3(g)} in Groups 5 and 6. The pump of vacuum was calibrated, reaching a pressure of 3.9 Pa in groups 3, 4 and 5, submitted to Low Pressure. The count of CFU/mL showed that the reduction in the load of *S. aureus* in Group 3 was 33.25% compared to the C+ (p<0.05). In Groups 4 and 5 the reduction was 100% (p<0.001), while Group 6 reduced the bacterial load by 99.19% (p<0.001). The innovation of this work was the evaluation of Low Pressure as a microbicide alternative. The study parameters proved the effectiveness of the application of Ozone Gas and its association with Low Pressure in the inactivation of *S. aureus*. The experimental protocol is promising for sterilization and will be tested on other microorganisms, such as: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Mycobacterium massiliense*.

Keywords: Biomedical Engineering. Ozone Gas. Low Pressure. *Staphylococcus aureus*. Suture Needles.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
2.3 Justificativa.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Classificação dos Materiais Cirúrgicos e Níveis de Desinfecção.....	19
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.3 Métodos de Esterilização por Óxido de Etileno e Radiação Gama.....	21
3.4 Baixa Pressão	23
3.5 Ozônio.....	27
3.5.1 Concentração e Dose de Ozônio	29
3.5.2 Potencial e Mecanismo de Ação do Ozônio.....	30
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Tipo de Estudo.....	33
4.2 Local e Período de Realização do Protocolo Experimental ...	33
4.3 Desenvolvimento do Aparato para Aplicação de Ozônio e Baixa Pressão.....	33
4.4 Amostra.....	35
4.5 Esquema de Montagem para Aplicação de Baixa Pressão e Gás Ozônio.....	35
4.6 Parâmetros de Baixa Pressão.....	36
4.7 Dosagem de Ozônio.....	37
4.8 Protocolo Experimental.....	38
4.8.1 Preparo da Suspensão Bacteriana Inicial e Diluições Decimais.....	39
4.8.2 Contaminação das agulhas.....	40

4.8.3 Preparo das amostras Grupo 1: Controle negativo (C-) .	40
4.8.4 Preparo das amostras Grupo 2: Controle positivo (C+).	41
4.8.5 Preparo das amostras Grupo 3: Baixa Pressão 30 min...	41
4.8.6 Preparo das amostras Grupo 4: Baixa Pressão 30 min + Gás Ozônio 30 min	41
4.8.7 Preparo das amostras Grupo 5: Baixa Pressão 30 min + Gás Ozônio 60 min	42
4.8.8 Preparo das amostras Grupo 6: Gás Ozônio 60 min.....	42
4.8.9 Análise Microbiológica	43
4.8.10 Leitura dos resultados.....	43
4.9 Análise Estatística	44
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	1A. Desenho técnico do flange usinado em nylon	34
	1B. Montagem parcial do aparato experimental.....	34
Figura 2	Divisão dos grupos amostrais	35
Figura 3	Esquema de montagem para aplicação de Baixa Pressão e Gás Ozônio.....	36
Figura 4	Etapas do protocolo experimental.....	38
Figura 5	Redução Bacteriana (%) em relação ao Grupo Controle Positivo (C+)	47
Figura 6	Redução Bacteriana Logarítmica (log) em relação ao Grupo Controle Positivo (C+)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pressão de Vapor (P_v) [mmHg] x Temperatura (T) [°C]	26
Tabela 2	Média e Erro Padrão da contagem bacteriana dos grupos	45
Tabela 3	Análise estatística com as diferenças significativas entre grupos	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	Grupo Baixa Pressão
BP+O ₃ 30	Grupo Baixa Pressão por 30 min + Gás Ozônio por 30 min
BP+O ₃ 60	Grupo Baixa Pressão por 30 min + Gás Ozônio por 60 min
C+	Grupo Controle Positivo
C-	Grupo Controle Negativo
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFC	Clorofluorcarbono
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EtO	Óxido de Etileno
kPa	Quilopascal
L	Litros
LPV	Low-pressure-vaporization (Vaporização a Baixa Pressão)
mbar	Milibar
min	Minutos
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
µg	Microgramas
mg	Miligramas
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
O _{3(g)}	Gás Ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSHA	Occupational Safety and Health Association
Pa	Pascal
POL	Produtos de Oxidação Lipídica

ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAL	Sterility Assurance Level - Nível de Garantia de Esterilidade
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
O ₃ 60	Grupo Gás Ozônio por 60 min

1. INTRODUÇÃO

Segundo ANVISA (2010), os materiais cirúrgicos são classificados em: artigo crítico: aquele utilizado em procedimentos de alto risco, que penetra tecidos ou órgãos e requer esterilização para seu uso; artigo semicrítico: aquele que entra em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa do paciente e requer desinfecção de alto nível ou esterilização para seu uso.

A desinfecção é um processo físico ou químico que destrói a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos, podendo ser de baixo, intermediário ou alto nível. A desinfecção de nível intermediário é um processo físico ou químico que destrói microrganismos patogênicos, microbactérias, maioria dos vírus e fungos. Já a desinfecção de alto nível é um processo físico ou químico que destrói todos os microrganismos de artigos semicríticos, exceto um número elevado de esporos bacterianos. Por sua vez, a esterilização é um processo validado que torna um artigo crítico e/ou semicrítico livre de todas as formas viáveis de microrganismos. (ANVISA, 2010).

O que determina o nível de desinfecção ou esterilização necessário para um dispositivo médico é o seu uso pretendido, considerando o grau de risco de infecção. Itens críticos são aqueles que entram em contato com tecidos estéreis, como instrumentos cirúrgicos, que requerem esterilização. Itens semicríticos que entram em contato com as membranas mucosas, como endoscópios, requerem desinfecção de alto nível. Itens não críticos que entram em contato apenas com a pele intacta, como estetoscópios, requerem desinfecção de baixo nível (RUTALA; WEBER, 2016).

O vapor é o método de esterilização mais utilizado para instrumentos médicos e cirúrgicos, que não são danificados pelo calor, vapor, pressão ou umidade. Para o reprocessamento de equipamentos críticos termossensíveis, tecnologias de esterilização de baixa temperatura, como óxido de etileno (EtO) ou plasma de gás peróxido de hidrogênio, são recomendadas (RUTALA; WEBER, 2008). O gás óxido de etileno é um agente esterilizante de dispositivos

médicos devido à sua eficácia e compatibilidade com a maioria dos materiais (SHINTANI, 2017).

A esterilização por radiação ionizante é considerada o padrão ouro e oferece muitas vantagens sobre os processos convencionais de vapor ou EtO e não apresenta nenhum dos problemas toxicológicos da esterilização por EtO, devido aos resíduos de solventes que podem permanecer no material esterilizado (SINGH et al., 2016). Além disso, deve-se levar em consideração a duração do processo, que varia de 3 a 12h de exposição, além do tempo de aeração necessário para remoção de EtO residual (RUTALA; WEBER, 2004).

A esterilização por radiação gama é utilizada em larga escala pelos fabricantes de instrumentos cirúrgicos, possibilitando o fornecimento de instrumentos estéreis já embalados (ARIAS et al., 2020). No entanto, há necessidade de grandes instalações, disponibilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) adequados para redução de riscos ocupacionais e preservação do meio ambiente, fazendo com que o custo deste procedimento se torne elevado (SINGH et al., 2016).

Tal demanda sugere a necessidade de formas alternativas de esterilização de materiais cirúrgicos, como o ozônio que é um composto natural, facilmente gerado *in situ* a partir do oxigênio ou do ar, por meio de um gerador de ozônio. Ele é capaz de destruir os microrganismos através da oxidação de componentes celulares vitais. Atua sobre: bactérias; fungos (leveduras e filamentosos); vírus e protozoários (BOCCI, 2011). Sua eficácia microbicida em *Staphylococcus aureus* já foi reportada em diversos estudos (HUDSON; SHARMA; VIMALANATHAN, 2009; LOPES et al., 2015; TORMIN et al., 2016).

S. aureus, a bactéria utilizada no protocolo experimental para contaminação das agulhas de sutura, é uma bactéria Gram-positiva, unicelular, procarionte, esférica. não formadora de esporos (BARBOSA, GOMEZ, TORRES, 2018). A ocorrência típica dos cocos é em cachos semelhantes a uvas no pus e nas culturas. *Staphylococcus aureus* são cocos esféricos, com aproximadamente 1 µm de diâmetro (KUMAR, 2012). Seu citoplasma preenche todo o espaço delimitado pela membrana celular e a parte fluida da matriz citoplasmática, que é denominado de citosol, tem consistência de gel com 20%

em peso de proteínas e 70% de água e, em suspensão, encontram-se os ribossomos, além de diversas substâncias, como aminoácidos, lipídios, carboidratos, nucleotídeos, RNA, nutrientes energéticos e íons (BARBOSA, GOMEZ, TORRES, 2018; FOSTER, GEOGHEGAN, 2015; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

No processo de vaporização da água a baixa pressão é necessário vencer as forças de coesão entre as moléculas de água e superar a tensão superficial existentes na interface entre água e ar, dentro da câmara de vaporização. A grande quantidade de energia necessária para a vaporização da água é retirada da própria massa de água. As moléculas de água entram em fluxo contínuo migrando entre as fases líquida e gasosa, até alcançarem o equilíbrio dinâmico, onde a quantidade de moléculas de água que passam para a fase líquida e para a fase vapor se igualam. Nesse estágio, a pressão exercida pelo vapor de água é denominada pressão de vapor de saturação. A vaporização da água a baixa pressão ocorre conforme a pressão é gradualmente diminuída e se inicia com a evaporação na superfície livre da água e, quando a pressão cai abaixo do valor de saturação, que a 20°C é de 17,53 mmHg, começa a evaporação instantânea, responsável pela maior parte da produção de vapor (AUGUSTO et al., 2012; INCROPERA, DEWITT, 2007; LUTGENS, TARBUCK, 1989; RAKNESS et al., 1996).

A possibilidade de testar os efeitos dos mecanismos apresentados no objeto de estudo, despertou o interesse em desenvolver um protocolo experimental inovador, a partir do uso da Baixa Pressão, para verificação de sua ação microbicida.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da inativação de *Staphylococcus aureus* em agulhas de sutura contaminadas experimentalmente *in vitro*, após submetê-las à Baixa Pressão, Gás Ozônio e as duas técnicas associadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O estudo proposto teve como objetivo avaliar a eficácia da baixa pressão, do gás ozônio e os dois associados na inativação de *Staphylococcus aureus* em agulhas de sutura contaminadas experimentalmente.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a eficácia da inativação de *S. aureus* após aplicação de sessões de diferentes técnicas:
 - Baixa Pressão (30 min);
 - Baixa Pressão (30 min) seguida de gás ozônio (30 min);
 - Baixa Pressão (30 min) seguida de gás ozônio (60 min);
 - Gás Ozônio (60 min).
- Definir um protocolo ideal para inativação de *S. aureus* em agulhas de sutura contaminadas experimentalmente, empregando baixa pressão, gás ozônio e as duas técnicas associadas.

2.3 Justificativa

Faz-se necessário entender os mecanismos de ação da Baixa Pressão e Gás Ozônio para a viabilidade do presente estudo. *Staphylococcus aureus*, o microrganismo que foi utilizado na inoculação das agulhas de sutura, é uma bactéria Gram positiva, que apresenta 70% de água em seu citoplasma.

O processo para vaporização da água a baixa pressão ocorre conforme a pressão do vapor d'água cai abaixo da pressão de vapor de saturação de 17,53 mmHg a 20°C, quando a produção de vapor passa a ser governada pelo processo de ebulição da água, um segundo estágio que começa repentinamente quando a pressão cai abaixo do valor de saturação e a água entra em ebulição,

esta segunda fase é responsável pela maior parte da produção de vapor. Parte-se do princípio da vaporização da água a baixa pressão, como possível mecanismo de ação da baixa pressão no biofilme de *S. aureus* formado na superfície das agulhas de sutura.

O mecanismo de ação do ozônio nas células bacterianas tem início com a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO), seguida da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes principalmente na membrana celular. Os peróxidos e as espécies reativas de oxigênio danificam a integridade da parede celular e membrana citoplasmática, além de outras moléculas celulares. Os peptídeos solúveis, assim como a glutatona e proteínas em bicamadas lipídicas fornecem alvos potenciais para o ozônio.

Diversos estudos comprovam a ação microbicida do gás ozônio, mas ainda não há pesquisas que avaliam a Baixa Pressão e sua associação com o Gás Ozônio na inativação de *Staphylococcus aureus*, o que justifica a realização deste estudo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação dos Materiais Cirúrgicos e Níveis de Desinfecção

Segundo ANVISA (2010), os materiais cirúrgicos são classificados em: artigo crítico: aquele utilizado em procedimentos de alto risco, que penetra tecidos ou órgãos e requer esterilização para seu uso; artigo semicrítico: aquele que entra em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa do paciente e requer desinfecção de alto nível ou esterilização para seu uso. Já os artigos não críticos, que entram em contato apenas com a pele íntegra, como os estetoscópios, requerem desinfecção de baixo nível (RUTALA; WEBER, 2016).

A desinfecção é um processo físico ou químico que destrói a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos, podendo ser de baixo, intermediário ou alto nível. A desinfecção de nível intermediário é um processo físico ou químico que destrói microrganismos patogênicos, microbactérias, maioria dos vírus e fungos. Já a desinfecção de alto nível é um processo físico ou químico que destrói todos os microrganismos de artigos semicríticos, exceto um número elevado de esporos bacterianos. Por sua vez, a esterilização é um processo validado que torna um artigo crítico e/ou semicrítico livre de todas as formas viáveis de microrganismos. (ANVISA, 2010).

A agulha de sutura é considerada um artigo crítico por ser utilizado em procedimentos de alto risco, nos quais penetra tecidos ou órgãos, requer, portanto, a esterilização para uso (ANVISA, 2010).

3.2 *Staphylococcus aureus*

Alexander Ogston, cirurgião escocês, publicou um estudo (OGSTON, 1880), que descrevia um *coco* formador de colônia como causador de uma série de doenças piogênicas no homem. Em 1882 ele chamou o microrganismo de *Staphylococcus*, um nome derivado do grego *staphyle*, que significa cacho de uvas e *cocos*, cujo significado é grão ou baga. Em seus experimentos com

cobaias, ele demonstrou que o pus continha *Staphylococcus*. O primeiro a cultivar *Staphylococcus* em cultura pura foi Rosenbach em 1884 e a estudar suas características em laboratório. Ele observou que as colônias cresciam em meio sólido e nomeou o microrganismo de *Staphylococcus pyogenes aureus*. O uso de trinômios não foi bem aceito entre os taxonomistas, devido às regras estritas da nomenclatura bacteriológica. Finalmente, adotou-se o nome *Staphylococcus aureus* e a espécie-tipo do gênero *Staphylococcus* é aceita como *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (BAIRD-PARKER, 1990).

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, unicelular, procarionte, esférica não formadora de esporos, sem motilidade, que se divide em mais de um plano, é um microrganismo facultativamente anaeróbio, catalase-positivo, oxidase-negativo e pode crescer em NaCl a 10% (FOSTER, GEOGHEGAN, 2015).

Dentre as estruturas essenciais da célula de uma bactéria Gram-positiva estão a parede celular e a membrana citoplasmática. A membrana que recobre e delimita o citoplasma é constituída por uma bicamada de fosfolipídios, acumula grande quantidade de proteínas uma vez que exerce diversas funções como: permeabilidade seletiva, secreção, obtenção de energia, quimiotaxia, biossíntese de componentes lipídicos da parede celular e de estruturas externas. A parede celular tem espessura de 20 a 50 nm, bem mais espessa que a de bactérias Gram-negativas, e é basicamente formada por peptidoglicanos, contém grande quantidade de ácidos teicoicos que lhe conferem maior rigidez. O ácido lipoteicoico faz a comunicação entre a membrana plasmática e a parede celular (BARBOSA, GOMEZ, TORRES, 2018; FOSTER, GEOGHEGAN, 2015).

Os ácidos teicoicos são responsáveis pela especificidade (antigênica da parede celular, por apresentarem radicais que induzem resposta imunológica. Em bactérias patogênicas como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, atuam como adesinas, permitindo sua fixação às superfícies epiteliais (BARBOSA, GOMEZ, TORRES, 2018).

O citoplasma preenche todo o espaço delimitado pela membrana celular procariótica. A parte fluida da matriz citoplasmática é denominada de citosol, que não é uma solução aquosa simples, pois tem consistência de gel com 20% em peso de proteínas e contém diversas substâncias, como aminoácidos, proteínas,

lipídios, carboidratos, nucleotídeos, RNA, nutrientes energéticos e íons. O citosol é constituído por cerca de 70% de água e, em suspensão, encontram-se os ribossomos, que são as únicas organelas celulares dos procariontes (BARBOSA, GOMEZ, TORRES, 2018; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

Cerca de 30% das pessoas hospedam o *Staphylococcus aureus* na nasofaringe e, muitas vezes, não causa nenhuma patologia, entretanto, pode causar infecções. Em ambientes de assistência à saúde, essas infecções por *S. aureus* podem ser graves ou fatais, incluindo: bacteremia ou sepse quando a bactéria se espalha para a corrente sanguínea; pneumonia; endocardite (infecção das válvulas cardíacas), que pode causar insuficiência cardíaca; osteomielite (infecção óssea), que pode ser causada por *Staphylococcus aureus* presente na corrente sanguínea ou por contato direto (CDC, 2011).

Indivíduos sadios são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, e podem alojar o microrganismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na genitália. A partir destes sítios, o *S. aureus* pode contaminar a pele e membranas mucosas do paciente, objetos inanimados ou outros indivíduos por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais devido a fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados. *Staphylococcus aureus* apresentam como características de crescimento: colônias amarelas, com tamanho aproximado de 0,75 mm de diâmetro (ANVISA, 2004).

3.3 Métodos de Esterilização por Óxido de Etileno e Radiação Gama

Atualmente, três dos processos de esterilização industrial para artigos médicos mais utilizados são: Vapor à alta pressão (Autoclave), Óxido de Etileno (EtO) e Radiação Ionizante ou Radiação Gama. O vapor é o método de esterilização mais utilizado para instrumentos médicos e cirúrgicos que não são danificados pelo calor, vapor, pressão ou umidade.

O EtO é o esterilizante menos degradante por sua eficácia e compatibilidade com a maioria dos materiais, ele é capaz de esterilizar artigos médicos sensíveis ao calor, umidade ou radiação sem afetar a funcionalidade

deles. No entanto, é um gás inflamável, explosivo e tóxico, que devido à sua complexidade, requer uma área devidamente projetada, implementação de boas práticas de laboratório, equipe treinada e medição dos níveis de exposição dos funcionários envolvidos, o que acaba gerando altos custos. A exposição a altos níveis de EtO pode causar convulsões, paralisia e coma, além de danificar o fígado e os rins, pode afetar o sistema nervoso e causar catarata, soma-se a isso sua classificação como agente carcinogênico. (GIMENO et al., 2018; SHINTANI, 2017). Soma-se a isso a importante consideração em relação à duração do processo, que varia de 3 a 12h de exposição, além do tempo de aeração necessário para remoção de EtO residual (RUTALA; WEBER, 2004).

O procedimento para esterilização mais recomendado para um artigo médico que não seja termossensível é a autoclave, uma vez que a esterilização por calor úmido e elevada pressão apresenta baixo custo, pouca complexidade e não gera resíduos tóxicos. Já a radioesterilização por raios gama pode provocar degradação em alguns dispositivos médicos (SHINTANI, 2017).

O efeito microbicida da radiação ionizante é principalmente devido ao dano genético e à inibição da divisão celular e existem dois mecanismos direto e indireto para o dano celular e inativação de bactérias, fungos e vírus. A radiação ionizante induz danos estruturais, que inibem a síntese de DNA, causa erros em síntese de proteínas, levando à morte celular. O efeito indireto da radiação ocorre devido à formação de radicais livres aquosos como resultado da radiólise da água nos microrganismos. A radiação interage com a água levando à produção de radicais livres e radicais peróxidos que danificam moléculas biológicas como o DNA e inativam o processo de reprodução causando a morte de microrganismos (SINGH et al., 2016).

A esterilização por radiação ionizante oferece muitas vantagens sobre os métodos convencionais baseados em calor ou óxido de etileno. A radioesterilização não apresenta nenhum dos problemas toxicológicos que a esterilização com óxido de etileno apresenta, devido aos resíduos de solvente que podem permanecer no material, entretanto é mais dispendiosa do que outros métodos de esterilização. Há necessidade de grandes instalações, disponibilização de EPI's adequados para redução de riscos ocupacionais,

cumprimento da legislação ambiental, fazendo com que o custo deste procedimento se torne elevado (SINGH et al., 2016).

O processamento por raios gama é utilizado em grande escala pelos fabricantes de instrumentos cirúrgicos, possibilitando o fornecimento dos instrumentos estéreis já embalados (ARIAS et al., 2020). Papel e películas multicamadas são componentes de embalagens para esterilização por radiação contendo artigos cirúrgicos. Segundo estudo, o papel mostra-se mais sensível à radiação em relação ao plástico e os efeitos foram mais pronunciados em brilho, pH, resistência ao rasgo, força de ruptura e resistência à tração. Em relação ao filme plástico, nenhum orifício foi induzido pela radiação e os efeitos na resistência à tração não foram significativos (PORTO; NAPOLITANO; BORRELY, 2018).

Instrumentos rotativos de liga Níquel-Titânio foram tratados termicamente e submetidos à irradiação gama ou esterilização em autoclave, ambos afetaram de forma diferente na redução da vida útil destes instrumentos (ARIAS et al., 2020). Ademais, de acordo com Harrell et al. (2018), existem os riscos e limitações associados à radiação gama quando aplicada em outras áreas: como potencial oncogênico em alimentos irradiados; modificações significativas nas características físico-químicas de artigos médicos, afetando seu uso clínico; além das alterações moleculares em materiais biológicos.

3.4 Baixa Pressão

A aplicação da baixa pressão tem sido estudada em diversas aplicações como na tecnologia de resfriamento a vácuo que é baseada na rápida evaporação de parte da umidade sob vácuo (PAL et al., 2012; SUN, ZHENG, 2006; ZHU, GENG; SUN, 2019), no processo de vaporização a baixa pressão e vaporização instantânea da água (AUGUSTO et al., 2012; WANG et al., 2019) e na secagem a vácuo (NAZEERI et al., 2020; NIMMOL et al., 2007; ORIKASA et al., 2014).

O resfriamento a vácuo pode ser usado para reduzir o tempo de processamento, estender a vida útil e melhorar a qualidade e a segurança do

produto, com superioridade na taxa de resfriamento, uniformidade, higiene e baixo consumo de energia (SUN; ZHENG, 2006). Este processo é dividido principalmente em três etapas. O primeiro estágio é a temperatura constante e estágio de despressurização, e sem resfriamento. Quando a pressão cai para a pressão de saturação correspondente à temperatura inicial do produto, a água começa a evaporar. Com a evaporação contínua da água, a temperatura cai rapidamente para o nível necessário. O terceiro estágio é o de recuperação de pressão, quando a válvula de ventilação é aberta e o ar flui para a câmara para restaurar a pressão circundante (ZHU; GENG; SUN, 2019).

A vaporização da água a baixa pressão ou LPV (Low Pressure Vaporization) é composta de uma câmara de vaporização vedada, contendo um volume de ar e água, uma bomba de vácuo e um condensador de vapor. A baixa pressão necessária na câmara de vaporização é alcançada com a bomba de vácuo. Na interface entre água e ar, as moléculas no interior do líquido são atraídas, em todas as direções por moléculas vizinhas, por forças de atração intermoleculares que são denominadas forças de coesão, enquanto as moléculas na superfície sofrem forças de atração que as puxam para o interior do líquido. Esta força é equilibrada pelas forças repulsivas das moléculas abaixo da superfície que estão sendo comprimidas, gerando a tensão superficial (AUGUSTO et al., 2012; INCROPERA, DEWITT, 2007).

No processo de vaporização da água é necessário vencer as forças de coesão entre as moléculas e superar a tensão superficial. A grande quantidade de energia necessária para a vaporização da água, que é o calor latente da mudança de fase, é retirada da própria massa de água. As moléculas de água entram em fluxo contínuo migrando entre as fases líquida e gasosa, quando migram do líquido acumulam-se em forma de vapor d'água acima do líquido e, algumas moléculas retornam à fase líquida. Desta forma, um estado de equilíbrio dinâmico pode ser atingido, onde a quantidade de moléculas de água que passam para a fase líquida e para a fase vapor se igualam. Nesse estágio, a pressão exercida pelo vapor de água é denominada pressão de vapor de saturação (AUGUSTO et al., 2012; INCROPERA, DEWITT, 2007; LUTGENS, TARBUCK, 1989).

A LPV da água é acompanhada pela evaporação da superfície livre e pela vaporização em massa, sempre que a pressão diminui para um valor abaixo da pressão de saturação. A LPV ocorre em dois estágios distintos conforme a pressão é gradualmente diminuída: um período inicial, com apenas evaporação na superfície livre, enquanto o ar está sendo removido de seu entorno, e um segundo estágio que começa repentinamente quando a pressão cai abaixo do valor de saturação e há aumento da taxa de evaporação. Esta segunda fase pode ser chamada evaporação instantânea e é responsável pela maior parte da produção de vapor (AUGUSTO et al., 2012).

Um outro estudo experimental desenvolveu um modelo matemático do fenômeno físico associado à evaporação instantânea da água sob pressão reduzida (WANG et al., 2019).

A secagem é um processo no qual a água é removida para interromper ou retardar o crescimento de microrganismos deteriorantes e a ocorrência de reações químicas. Já a secagem a vácuo é um processo no qual o material úmido é seco sob pressão subatmosférica (ORIKASA et al., 2014).

Estudo recente de Nazeeri et al. (2020), discute a secagem a vácuo na regeneração de máscaras N95 higienizadas com solução de etanol 70°, que perderam 40% da eficácia, sendo que tal perda não ocorreu por ação do etanol e sim devido à umidade remanescente nas fibras da máscara. O desempenho se recuperou nitidamente ao aplicar o vácuo na secagem das máscaras a uma pressão entre 0,1 e 2,0 kPa (0,75 e 15 mmHg), bem abaixo das pressões de vapor onde o etanol e a água bruta seriam normalmente removidos a 20°C, ou seja, 5,8 kPa e 2,3kPa (43,5 e 17,53 mmHg), respectivamente.

Outros dois estudos (NIMMOL et al., 2007; ORIKASA et al., 2014) discutem a aplicabilidade da secagem a vácuo na desidratação de frutas. No primeiro, uma associação de vapor superaquecido a baixa pressão e radiação infravermelha foi utilizada para a secagem de fatias de banana e observou que o menor tempo de secagem foi obtido conforme a pressão diminuía. O experimento foi realizado nas temperaturas de 70, 80 e 90°C, com pressões de 7 e 10 kPa (52,5 e 75 mmHg), concluindo que os melhores resultados foram obtidos com 80 °C para ambas as pressões (NIMMOL et al., 2007). No segundo,

foram utilizadas temperaturas de 50, 60 e 70 °C e uma pressão de secagem a vácuo de 3 kPa (22,5 mmHg), relatando os impactos do ar quente e da secagem a vácuo nos atributos de qualidade de fatias de kiwi, concluindo que a mudança de cor após a secagem a vácuo nas temperaturas de teste, foi significativamente menor do que a secagem a ar quente, $p < 0,01$ (ORIKASA et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta os valores de pressão de vapor d'água de acordo com a temperatura, onde aparece em destaque a pressão de vapor a 20 °C de 17,53 mmHg (2,3 kPa) (RAKNESS et al., 1996).

Tabela 1: Pressão de Vapor d'água (P_v) [mmHg] x Temperatura (T) [°C]

T (°C)	P_v (mmHg)	T (°C)	P_v (mmHg)	T (°C)	P_v (mmHg)	T (°C)	P_v (mmHg)
15,0	12,79	20,0	17,53	25,0	23,76	30,0	31,82
15,2	12,95	20,2	17,75	25,2	24,04	30,2	32,19
15,4	13,12	20,4	17,97	25,4	24,33	30,4	32,56
15,6	13,29	20,6	18,20	25,6	24,62	30,6	32,93
15,8	13,46	20,8	18,42	25,8	24,91	30,8	33,31
16,0	13,63	21,0	18,65	26,0	25,21	31,0	33,69
16,2	13,81	21,2	18,88	26,2	25,51	31,2	34,08
16,4	13,99	21,4	19,11	26,4	25,81	31,4	34,47
16,6	14,17	21,6	19,35	26,6	26,12	31,6	34,86
16,8	14,35	21,8	19,59	26,8	26,43	31,8	35,26
17,0	14,53	22,0	19,83	27,0	26,74	32,0	35,66
17,2	14,71	22,2	20,07	27,2	27,05	32,2	36,07
17,4	14,90	22,4	20,32	27,4	27,37	32,4	36,48
17,6	15,09	22,6	20,56	27,6	27,70	32,6	36,89
17,8	15,28	22,8	20,81	27,8	28,02	32,8	37,31
18,0	15,48	23,0	21,07	28,0	28,35	33,0	37,73
18,2	15,67	23,2	21,32	28,2	28,68	33,2	38,15
18,4	15,87	23,4	21,58	28,4	29,01	33,4	38,58
18,6	16,07	23,6	21,84	28,6	29,35	33,6	39,02
18,8	16,27	23,8	22,11	28,8	29,70	33,8	39,46
19,0	16,48	24,0	22,38	29,0	30,04	34,0	39,90
19,2	16,68	24,2	22,65	29,2	30,39	34,2	40,34
19,4	16,89	24,4	22,92	29,4	30,74	34,4	40,80
19,6	17,10	24,6	23,20	29,6	31,10	34,6	41,25
19,8	17,32	24,8	23,48	29,8	31,46	34,8	41,71

Fonte: Adaptado de RAKNESS et al. (1996)

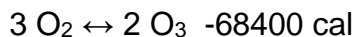
3.5 Ozônio

O ozônio foi descoberto em 1840 por Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) que trabalhava com uma pilha voltaica na presença de oxigênio, tal pilha ao formar o arco elétrico gerou uma descarga elétrica e o surgimento de um gás com um cheiro pungente característico, que poderia ser uma espécie de oxigênio superativo. Schönbein nomeou tal gás de ozônio (do grego ὄζειν “ozein” – cheiro). O primeiro gerador de ozônio foi construído em 1857 pelo alemão Weber von Siemens, tal invento era um tubo de superindução, posteriormente conhecido como Tubo de Siemens, formado por duas placas de eletrodo interpostas com alta tensão que, na presença de oxigênio, gerava o ozônio (BOCCI, 2011).

O ozônio tem sido estudado como um substituto do cloro no branqueamento da celulose para a fabricação de papel desde 1949, mas somente a partir de 1992 o ozônio começou a atingir seu potencial em escala comercial. Isso se deve às pressões ambientais para diminuir a descarga de orgânicos halogenados nas águas residuais das fábricas. No início da década de 1970, a tecnologia de geração de descarga corona era feita a partir do ar e produzia apenas 1 a 2% em peso de ozônio e, com a tecnologia existente, usando oxigênio de alta pureza, como matéria-prima, apenas 2 a 4% em peso podiam ser obtidos. As projeções eram de que a alimentação de oxigênio competiria com a alimentação de ar apenas para grandes estações de tratamento de água (ROUNSAVILLE; RICE, 1996).

Já na década de 1980, acreditava-se que o futuro do ozônio, especialmente em grande escala, estaria vinculado à sua geração a partir do oxigênio de alta pureza, quando foram estudados geradores de ozônio do tipo iron-lung e outro com nova tecnologia, operando com tubos dielétricos de pequeno diâmetro, aumentando a concentração de ozônio a partir do oxigênio de alta pureza para 6 a 11%. Esse valor foi aumentado para 14 a 16% no início da década de 1990, com concomitante melhoria na eficiência energética, impactando em redução de custos na geração de ozônio (ROUNSAVILLE; RICE, 1996).

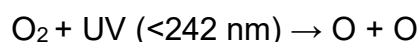
O gás ozônio puro tem uma suave cor azul-celeste com um cheiro acre e pungente, cuja molécula é composta por três átomos de oxigênio (O₃) e é formado a partir de oxigênio puro (O₂) por meio de um processo endotérmico permitido por gradientes de tensão muito alta configurados entre os eletrodos do tubo da Siemens, pela reação (BOCCI, 2011):



Nota-se que essa reação é reversível, significando que o ozônio se decompõe espontaneamente e, portanto, dificilmente é armazenável. Além disso, o tempo de decomposição da molécula de gás ozônio depende da temperatura, tal que a 20 °C a concentração de ozônio é reduzida à metade em 40 min, a 30 °C a mesma redução ocorre em 25 min, e a -50 °C é reduzida à metade somente após três meses (BOCCI, 2011).

A produção natural de ozônio pode ocorrer pela ação das radiações UV, que compreende a faixa entre 100 e 380 nm, e pela descarga elétrica durante uma tempestade, uma vez que, tal descarga catalisa a formação de ozônio a partir do oxigênio atmosférico (BOCCI, 2011).

O ozônio está presente em toda a atmosfera terrestre com maior concentração na estratosfera, cerca de 10 ppm, o equivalente a 0,02 µg/ml e, mais especificamente, na camada de ozônio, que filtra a radiação UV antes que chegue à superfície da Terra. A radiação UV catalisa a produção de O₃ (BOCCI, 2011):



A liberação dos CFC's (Clorofluorcarbonos) na atmosfera interage com as moléculas de ozônio, desestabilizando o equilíbrio dinâmico entre a reação de formação e dissociação natural do ozônio, o que vem provocando o afinamento desta camada e a formação do buraco na camada de ozônio (BOCCI, 2011).

O limiar de percepção de odor de ozônio é de cerca de 0,01 ppm. Segundo a Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (*Occupational Safety and Health Administration* - OSHA), o limite definido é de 0,1 ppm ao longo de um dia de 8 horas, 5 dias/semana para exposição humana, já para a OMS (Organização Mundial da Saúde), a exposição ocupacional máxima é de 0,06 ppm durante 8

horas de trabalho. Ressalta-se que, por ser um gás extremamente reativo e instável, precisa ser produzido e consumido de imediato, pois se degrada, voltando espontaneamente à forma de O_2 (BOCCI, 2011).

No sistema definido como ozonizador de descarga corona, o ozônio é formado quando o oxigênio escoar num espaço entre dois eletrodos metálicos submetidos à alta tensão elétrica, criando um campo de alta energia, este evento é denominado corona. A energia da descarga elétrica promove a quebra das moléculas de oxigênio (O_2) em átomos de oxigênio (O) que, na presença de um excesso de moléculas de O_2 , formam a molécula de O_3 . A concentração final de ozônio é inversamente proporcional ao fluxo de oxigênio, portanto quanto maior o fluxo de oxigênio, menor a concentração de ozônio (BOCCI, 2011).

3.5.1 Concentração e Dose de Ozônio

A concentração do gás ozônio emergente do gerador normalmente é expressa em mg/L, ou ainda $\mu\text{g/mL}$, outros fabricantes a especificam em g/m^3 . Há ainda reportes em ppm, sendo que $1 \text{ ppm } O_3 = 0,002 \mu\text{gO}_3/\text{mL}$ ou mgO_3/L (BOCCI, 2011).

Uma das formas de especificar a dosagem do gás ozônio num sistema é calculando a quantidade em massa de ozônio entregue ao sistema (RAKNESS et al., 1996), através da concentração de ozônio (C) [$\mu\text{g/mL}$ ou mg/L] multiplicada pela taxa de fluxo de gás Q [L/min], o que resultará na taxa de produção de ozônio (T_{O_3}), em massa por tempo [mg/min], sendo:

$$T_{O_3} = C \times Q$$

Ao se especificar o tempo (t) [min ou h] de exposição ao gás ozônio, pode-se expressar a quantidade de ozônio em massa (m_{O_3}) [mg ou g] inserida no sistema, assim:

$$m_{O_3} = T_{O_3} \times t$$

A Dosagem de Ozônio Aplicada também pode ser expressa em mg/cm^2 (VAN LEEUWEN, 2015), dividindo-se a quantidade de ozônio em massa (mO_3) pela área da superfície exposta ao gás ozônio, dada em cm^2 .

3.5.2 Potencial e Mecanismo de Ação do Ozônio

A primeira aplicação terapêutica do ozônio ocorreu durante a 1.^a Guerra Mundial para o tratamento de gangrena em soldados alemães, sendo que seu uso na medicina foi motivado pela falta de antibióticos e pelas suas propriedades desinfetantes. Tais propriedades possibilitaram também seu uso em mais de 3000 estações de tratamento de água no mundo (BOCCI, 2011).

O ozônio, sendo um oxidante potente, reage imediatamente com uma série de moléculas presentes nos fluidos biológicos, nomeadamente antioxidantes, proteínas, hidratos de carbono e, preferencialmente, ácidos graxos poliinsaturados. A reação do ozônio com tantas moléculas implica dois processos fundamentais: a primeira reação é importante porque gera espécies reativas de oxigênio (ERO), que desencadeiam várias vias bioquímicas; a segunda reação é conhecida como peroxidação de lipídios, que gera o peróxido de hidrogênio e uma variedade de aldeídos conhecidos como produtos de oxidação lipídica (POL) (BOCCI, 2011).

O mecanismo de ação do ozônio na inativação de microrganismos tem início com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), seguida da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes principalmente na membrana celular. Os peróxidos e as espécies reativas de oxigênio danificam a integridade da parede celular e membrana citoplasmática, além de outras moléculas celulares. Os peptídeos solúveis, assim como a glutatona e proteínas em bicamadas lipídicas fornecem alvos potenciais para o ozônio. A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados dá origem a produtos solúveis em água, como aldeídos e peróxidos que se difundem no citosol e iniciam a oxidação de aminoácidos e proteínas (MEHLMAN; BOREK, 1987).

O potencial do gás ozônio e água ozonizada tem sido amplamente estudado em diversas áreas. Em estudo de Marson et al. (2016), que compara a técnica convencional com o glutaraldeído 2% e a água ozonizada na desinfecção de endoscópios gastrointestinais, esta mostrou-se eficaz ao reduzir em 2 log os microrganismos viáveis nas condições testadas.

Instrumentos odontológicos contaminados com *Streptococcus mutans*, que é o agente etiológico da cárie, foram expostos à onda ultrassônica e à água ozonizada isoladamente e associados, chegando à redução de 2 log para o ultrassom em 25 min de aplicação e 100% aos 30 min; aos 5 e 6 min de exposição à água ozonizada, com concentração de 25 e 30 ppm obteve-se 2 log de redução; já o uso simultâneo de ultrassom e água ozonizada eliminou 100% dos *Streptococcus mutans* (MOREIRA FONSECA et al., 2015).

A pesquisa de Martinelli et al. (2017), verificou a eficácia do ozônio (aquoso e gasoso) como uma tecnologia de sanitização alternativa para desinfetantes convencionais na redução da contaminação microbiana da água e do ar, sendo que a adição de ozônio à água chegou a resultados mais expressivos do que ao ar e, dentre os microrganismos estudados, houve redução de 98,9% de *Staphylococcus aureus*.

A atividade microbicida do gás ozônio e da água ozonizada foi avaliada em um estudo feito em várias superfícies contaminadas com esterco de gado, com o objetivo de apresentar o ozônio como alternativa para a higiene e biossegurança em fazendas, concluindo que a água ozonizada foi mais eficaz que o gás ozônio em superfícies lisas e moderadamente rugosas, porém ambas não foram efetivas na redução bacteriana em superfícies complexas, como a madeira (MEGAHED et al., 2018).

O gás ozônio mostra extrema versatilidade através da eficácia comprovada por sua ação acaricida em um estudo *in vitro*, onde o gás ozônio foi aplicado com eficácia em *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (carrapato) (MOREIRA et al., 2018).

A atividade microbicida do gás ozônio, objeto deste estudo, também é investigada em diversos trabalhos, como na pesquisa para utilização das propriedades antivirais do gás ozônio, em que foi desenvolvido um dispositivo

móvel para descontaminar quartos em instalações de saúde, hotéis e outros edifícios. No estudo, após a obtenção do pico de concentração de gás ozônio entre 20 e 25 ppm (0,04 e 0,05 mg/L, respectivamente), os 12 vírus testados, em diferentes superfícies duras e porosas, e na presença de fluidos biológicos, foram inativados e houve redução de 3 log (HUDSON; SHARMA; VIMALANATHAN, 2009).

Tormin et al. (2016), avaliou o efeito do gás ozônio em bactérias multirresistentes: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, causadoras da infecção hospitalar. Concluiu que nas condições de estudo, o gás ozônio com concentrações de 10 µg/mL, 4 µg/mL e 3 µg/mL por 2 e 4 minutos, aplicado em em frascos contendo 500 mL de água estéril bidestilada inoculados com 10⁸ UFC/mL de bactérias a 0,5 na escala de McFarland, tem efeito bactericida sobre as bactérias multirresistentes estudadas, obtendo melhores resultados para a concentração de 10 µg/mL por 4 min.

Em estudo de Lopes et al. (2015) com tubulação corrugada usada por pacientes traqueostomizados, ventilados mecanicamente em UTI, o emprego de gás ozônio mostrou a viabilidade na desinfecção de todos os grupos, com redução de 5 log em 4 grupos: ozônio 15 min, ultrassom (15 e 30 min) associado ao ozônio (15 min) e ácido peracético em comparação ao grupo ultrassom (60 min) que reduziu em 4 log a contaminação microbiana. O ozônio foi aplicado com concentração de 33 mg/L por 15 min com uma vazão de O₂ de 0,5 L/min.

O processo de esterilização empregando gás ozônio em materiais cirúrgicos termossensíveis inoculados com *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella entérica*, *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*, tendo como indicador biológico esporos de *Geobacillus stearothermophilus*. Foram analisados pelo teste de citotoxicidade *in vitro* e avaliação da superfície dos materiais por espectrofotometria com transformadas de Fourier (ATR-FTIR), cujos resultados validaram o processo, indicando o gás ozônio como alternativa eficaz e promissora para esterilização a baixa temperatura de dispositivos médicos (DE SOUZA BOTELHO-ALMEIDA, 2018).

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo *in vitro* a partir de análise microbiológica quantitativa com o intuito de avaliar a inativação de *Staphylococcus aureus* em agulhas de sutura contaminadas experimentalmente.

4.2 Local e Período de Realização do Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi realizado no Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), utilizando os Laboratórios: Apoio Mecânico, Biotecnologia e Desinfecção e Esterilização.

A primeira fase da coleta de dados foi feita de agosto a dezembro/2020. E os ensaios finais foram realizados no mês de junho/2021.

4.3 Desenvolvimento do Aparato para Aplicação de Gás Ozônio e Baixa Pressão

Para a realização do protocolo experimental foram definidos diversos materiais altamente compatíveis (inertes) ao ozônio, tais como silicone, vidro, aço inoxidável entre outros. Devido ao alto poder oxidativo deste gás, essa preconização evitava reações e gerações de subprodutos no processo que poderiam interferir no protocolo proposto. Inicialmente foi confeccionado, no Laboratório de Apoio Mecânico do CITÉ, um suporte perfil em “U” em chapa de aço inoxidável para acomodação das agulhas de sutura. Além disso, foi realizada a montagem de duto e conexões acoplados à tampa em aço inoxidável usinada, com o intuito de garantir a vedação entre a câmara de vidro e a tampa foi utilizado um elastômero (borracha), mangueiras específicas entre o conjunto citado e uma bomba de vácuo foram usadas para gerar baixa pressão no interior da câmara e posterior inserção do gás ozônio.

A figura 1A apresenta o desenho técnico do flange confeccionado em nylon a ser acoplada à tampa de aço inoxidável, já a figura 1B ilustra a montagem

parcial do aparato desenvolvido para aplicação do protocolo experimental, onde pode se observar a câmara de vidro, suporte em “U”, flange em nylon e a tampa em aço inoxidável, evidenciando as duas válvulas de esfera para abertura e fechamento da linha, sendo que a da direita é conectada à bomba de vácuo e a válvula da esquerda é conectada junto à saída do gerador de ozônio.

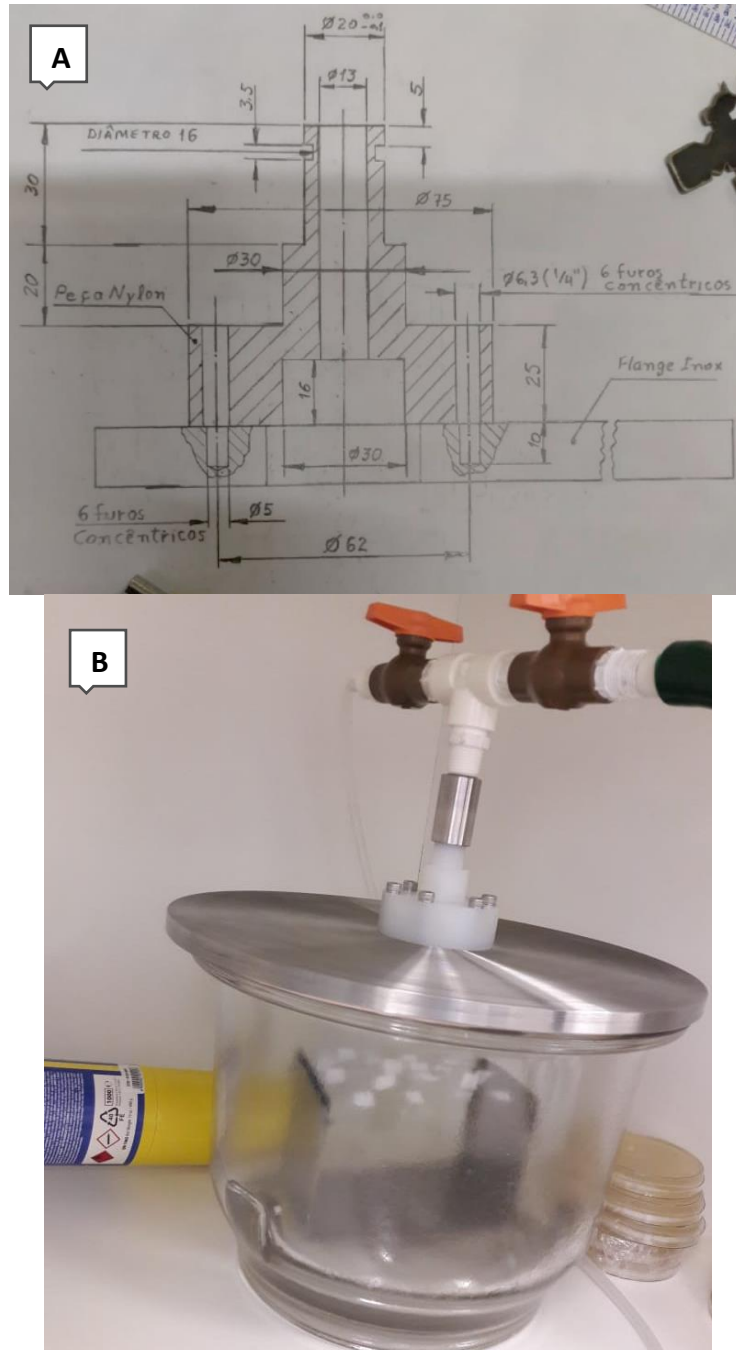


Figura 1: **1A.** Desenho técnico do flange usinado em nylon, que conecta a tampa em aço inoxidável aos dutos e válvulas, que por sua vez, se conectam à bomba de vácuo e gerador de ozônio. **1B.** Montagem parcial do aparato experimental, com suporte em “U” para a fixação das agulhas, dentro da câmara de vidro.

4.4 Amostra

A divisão dos grupos amostrais aparece esquematizada na figura 2. O experimento foi dividido em 6 grupos com 10 agulhas de sutura em cada grupo. As agulhas de sutura eram do tipo triangular, com formato 3/8 de círculo e com 3,0 cm de comprimento, sendo o fio de sutura de nylon monofilamento preto, com espessura de 4-0 (Suturbras, São José dos Campos, Brasil).

Grupo 1 (C-): Controle Negativo: agulhas de sutura esterilizadas por radiação gama.

Os Grupos 2 a 6 foram compostos de agulhas de sutura contaminadas experimentalmente com *S. aureus*.

Grupo 2 (C+): Controle Positivo

Grupo 3 (BP): Após Baixa Pressão por 30 min.

Grupo 4: BP+O₃30 – Após Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 30 min

Grupo 5: BP+O₃ 60 – Após Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio

Grupo 6: O₃60 – Após Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio.



Figura 2: Divisão dos grupos amostrais.

4.5 Esquema de Montagem para Aplicação de Baixa Pressão e Gás Ozônio

A figura 3 mostra o esquema de montagem do protocolo experimental para aplicação do gás ozônio e baixa pressão nos grupos amostrais 3 a 6. Sendo (1) Cilindro de O₂ medicinal usado para alimentação do gerador de ozônio na

formação de O_3 . (2) Gerador de Ozônio (O&L 1.5M, Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil). (3) Câmara de vidro com capacidade de 10 litros para acondicionamento do suporte com as agulhas e aplicação do gás ozônio e baixa pressão. (4) Suporte de aço inoxidável para acomodar as amostras. (5) Bomba de vácuo (S25B, LEYBOLD – TRIVAC, EUA).

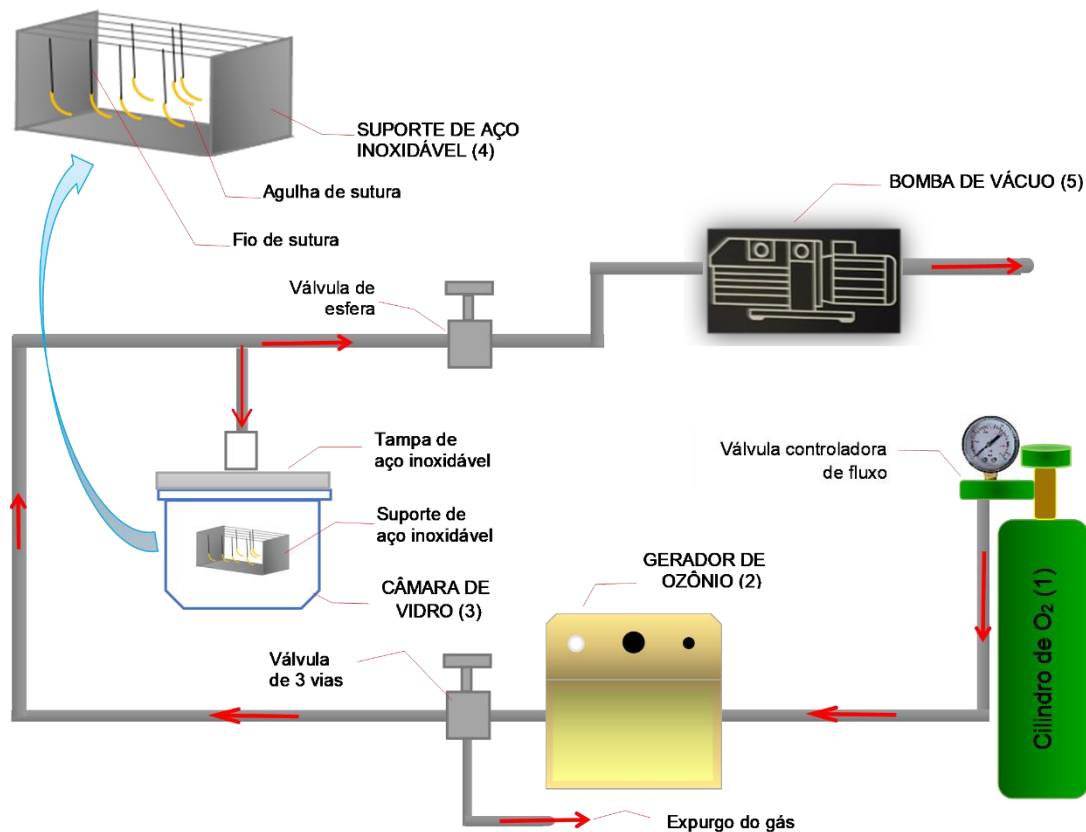


Figura 3: Esquema de montagem para aplicação de Baixa Pressão e Gás Ozônio

4.6 Parâmetros de Baixa Pressão

A bomba de vácuo foi usada em duas aplicações, sendo a primeira para submeter as amostras à baixa pressão por 30 min nos grupos 3, 4 e 5 e a segunda, para retirar o ar da câmara de vidro antes da ozonização das amostras dos grupos 4, 5 e 6, quando foi acionada por 5 min.

A bomba de vácuo, quando da sua aferição, prévia ao experimento, indicou a vazão de $25 \text{ m}^3/\text{h}$ ou $\approx 417 \text{ L}/\text{min}$ e a pressão final de $3,9 \text{ Pa}$.

4.7 Dosagem de Ozônio

Para o cálculo da dose de ozônio aplicada no protocolo experimental foram considerados os seguintes parâmetros:

Q: Vazão de O₂ [L/min];

C: Concentração de ozônio [mg/L];

T_{O₃}: taxa de O₃ em massa por tempo [mg/min];

m_{O₃}: quantidade de O₃ em massa aplicada [mg ou g];

t₃₀: tempo de exposição ao O₃: Grupo 4 = 30 min;

t₆₀: tempo de exposição ao O₃: Grupo 5 e Grupo 6 = 60min;

Considerando a Vazão do cilindro de O₂ = ¼ L/min = 0,25 L/min, o gerador de O₃, previamente aferido por medição fotométrica, oferecia uma Concentração de ozônio C=48 mg/L, portanto, a taxa de O₃ em massa por tempo utilizada no protocolo foi:

$$T_{O_3} = C \times Q = 48 \times 0,25 = 12 \text{ mg/min}$$

A quantidade de O₃ em massa aplicada no Grupo 4 foi:

$$m_{O_3 \text{ Grupo 4}} = T_{O_3} \times t_{30} = 12 \times 30 = 360 \text{ mg}$$

A quantidade de O₃ em massa aplicada no Grupo 5 e no Grupo 6 foi:

$$m_{O_3 \text{ Grupos 5,6}} = T_{O_3} \times t_{60} = 12 \times 60 = 720 \text{ mg}$$

Sabe-se que foram usadas 10 agulhas de sutura por grupo e que um biofilme é depositado em cada agulha contaminada. As agulhas têm 3 cm de comprimento, cujo corpo tem seção triangular, onde os três lados são iguais a 0,065 cm, resultando em uma área de superfície exposta ao gás ozônio aproximada de 6 cm², portanto a Dosagem de Ozônio Aplicada para o Grupo 4 foi de 60 mg/cm² e para os Grupos 5 e 6 foi de 120 mg/cm².

4.8 Protocolo Experimental

O protocolo experimental está esquematizado na figura 4 e detalhado nos itens a seguir.

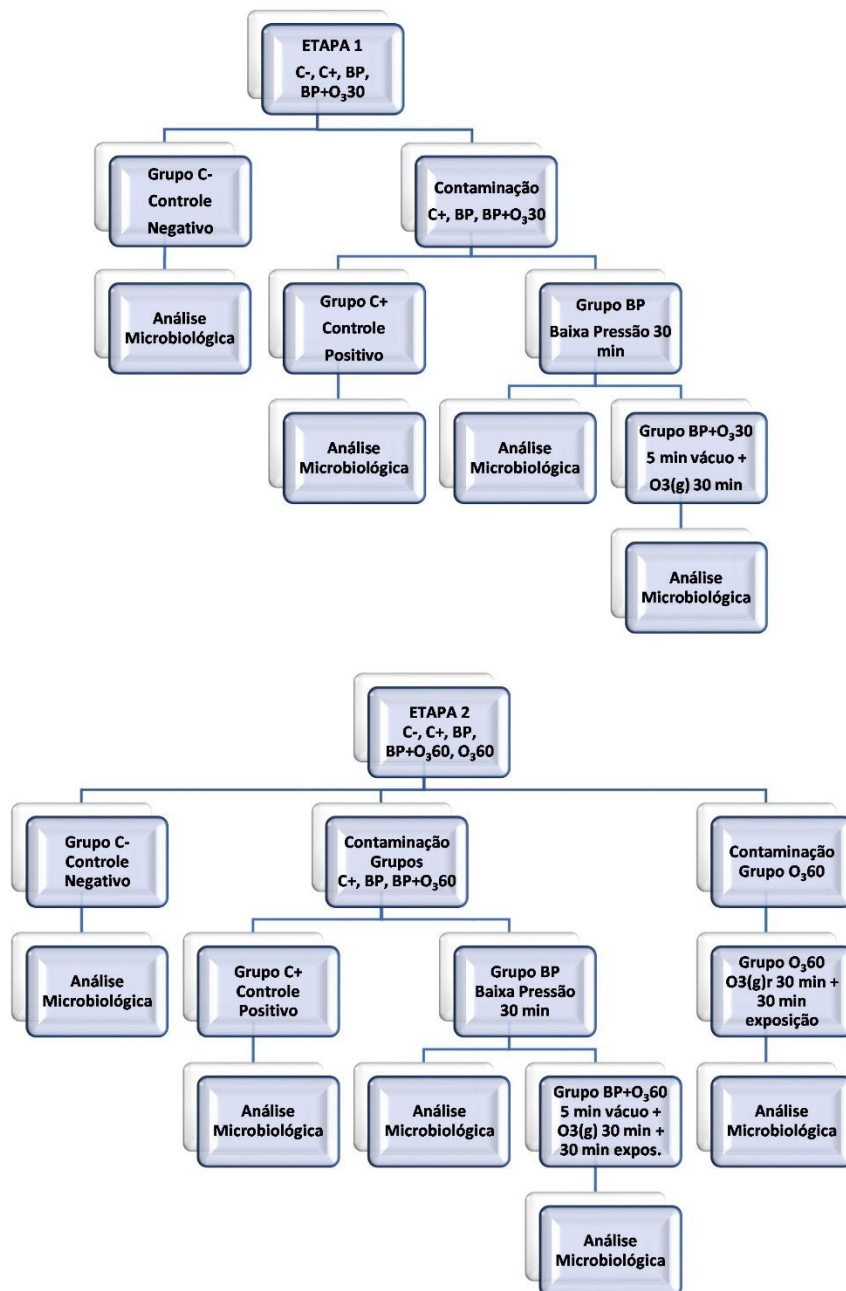


Figura 4: Etapas do protocolo experimental

4.8.1 Preparo da Suspensão Bacteriana Inicial e Diluições Decimais

a. Semeadura de *Staphylococcus aureus*

Na véspera da realização do protocolo experimental, foi realizada a semeadura da cepa de *S. aureus* (CCCD S007), na superfície de placas de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton Agar e incubadas em estufa microbiológica a 37 °C por 24 h.

b. Suspensão Bacteriana Inicial

Após a incubação da cultura de *Staphylococcus aureus* em estufa a 37 °C por 24 h foi coletada com fio de platina pequena quantidade de cultura e transferida para a solução salina estéril. O frasco foi agitado para homogeneização da suspensão bacteriana.

c. Diluições Decimais

Anteriormente à realização do Protocolo Experimental foi realizado um teste piloto para definição da diluição ia ser adotada para contaminação das agulhas. Partindo-se da diluição 10^7 UFC/mL foram realizadas diluições 1:10 (10^6), 1:100 (10^5) e 1:1000 (10^4). Dos resultados obtidos, após leitura das UFC/mL, definiu-se como ideal para a contaminação das agulhas, a diluição 1:10 (10^6 UFC/mL), concentração que é utilizada para verificar se um processo de esterilização fornece o nível de garantia de esterilidade desejado, SAL (Sterility Assurance Level) de 10^{-6} UFC/mL (SHINTANI, 2017).

d. Calibração do Turbidímetro

Foi utilizado o Turbidímetro (Plus, Alfakit, Florianópolis, Brasil) para leitura da turbidez, calibrando com água ultrapura e verificando com os padrões 0,5 e 4,0 da escala McFarland.

Realizou-se a leitura da Suspensão Bacteriana Inicial para verificar a necessidade de nova inoculação ou diluição para acertar a turbidez em torno de 10^7 UFC/mL.

e. Preparo da Diluição 1:10

Da Suspensão Bacteriana Inicial, foi coletado o volume de 10 mL, transferido para o frasco de vidro contendo 90 mL de solução salina estéril, obtendo-se a diluição 1:10 e, após agitação, procedeu-se à contaminação das agulhas de sutura estéreis.

4.8.2 Contaminação das agulhas

No frasco contendo a Suspensão Bacteriana 1:10 foram colocadas as agulhas estéreis dos grupos 2 a 6, com cerca de 6 cm de fio de sutura e levadas à estufa a 37 °C por 30 min. Após a incubação, as agulhas foram retiradas de dentro da Suspensão Bacteriana e penduradas no suporte de aço inoxidável para secagem por 10 min.

4.8.3 Preparo das amostras Grupo 1: Controle negativo (C-)

O preparo das amostras dos Grupos 1 a 6 foram realizados de forma asséptica, em capela de fluxo laminar. Com o porta-agulha, previamente esterilizado, segurou-se firmemente a extremidade de uma agulha de sutura estéril, cortando o fio de sutura e colocando-a no tubo Falcon contendo 10 mL de salina estéril. O tubo foi fechado, procedendo-se da mesma forma para as outras agulhas do grupo. Procedeu-se então à análise microbiológica descrita no item 4.8.9.

4.8.4 Preparo das amostras Grupo 2: Controle positivo (C+)

Após a secagem, descrita em 4.8.2, segurou-se firmemente com o portagulha, a extremidade de uma agulha presa ao suporte de aço inoxidável, cortando o fio e colocando-a no tubo Falcon contendo 10 mL de salina estéril. O tubo foi fechado, procedendo-se da mesma forma para as outras agulhas do grupo. Procedeu-se então à análise microbiológica descrita no item 4.8.9.

4.8.5 Preparo das amostras Grupo 3: Baixa Pressão 30 min

Na câmara de vidro foi colocado o suporte de aço inoxidável com as agulhas de sutura, posicionado o anel de vedação e fechada com a tampa de aço inoxidável. A bomba de vácuo foi acionada por 30 min, a câmara foi aberta e o suporte de aço inoxidável foi retirado.

Para a coleta de amostras pós-teste, segurou-se firmemente com o portagulha, a extremidade de uma agulha presa ao suporte de aço inoxidável, cortando o fio e colocando-a no tubo Falcon contendo 10 mL de salina estéril. O tubo foi fechado, procedendo-se da mesma forma para as outras agulhas do grupo. O suporte de aço inoxidável com as agulhas restantes foi colocado novamente no interior da câmara de vidro, devidamente fechada para continuidade do protocolo. Prosseguiu-se então à análise microbiológica descrita no item 4.8.9.

4.8.6 Preparo das amostras Grupo 4: Baixa Pressão 30 min + Gás Ozônio 30 min

Esse grupo recebeu o Gás Ozônio após o Grupo 3. A bomba de vácuo foi acionada por 5 min, com o intuito de retirar o ar de dentro da câmara de vidro, a válvula de controle de fluxo da bomba de vácuo foi fechada e a bomba desligada. A seguir a válvula de 3 vias foi posicionada para possibilitar a entrada de O₃ e O₂ na câmara de vidro, a vazão de alimentação do cilindro de oxigênio foi ajustada para ¼ L/min, acionando o gerador de ozônio por 30 min, aplicando-se

a dose de 60 mg/cm² de Gás Ozônio. Logo após o suporte de aço inoxidável foi retirado, repetindo-se o procedimento para coleta das amostras pós-teste descrito em 4.8.5.

4.8.7 Preparo das amostras Grupo 5: Baixa Pressão 30 min + Gás Ozônio 60 min

Esse grupo recebeu o Gás Ozônio após o Grupo 3. A bomba de vácuo foi acionada por 5 min, com o intuito de retirar o ar de dentro da câmara de vidro, a válvula de controle de fluxo da bomba de vácuo foi fechada e a bomba desligada. A seguir a válvula de 3 vias foi posicionada para possibilitar a entrada de O₃ e O₂ na câmara de vidro, a vazão de alimentação do cilindro de oxigênio foi ajustada para ¼ L/min, acionando o gerador de ozônio por 30 min, com 30 min adicionais de exposição das agulhas ao O₃, totalizando a dose de 120 mg/cm² de Gás Ozônio. Logo após o suporte de aço inoxidável foi retirado, repetindo-se o procedimento para coleta das amostras pós-teste descrito em 4.8.5.

4.8.8 Preparo das amostras Grupo 6: Gás Ozônio 60 min

A bomba de vácuo foi acionada por 5 min, com o intuito de retirar o ar de dentro da câmara de vidro, a válvula de controle de fluxo da bomba de vácuo foi fechada e a bomba desligada. A seguir a válvula de três vias foi posicionada para possibilitar a entrada de O₃ e O₂ na câmara de vidro, a vazão de alimentação do cilindro de oxigênio foi ajustada para ¼ L/min, acionando o gerador de ozônio por 30 min, com 30 min adicionais de exposição das agulhas ao O₃, totalizando a dose de 120 mg/cm² de Gás Ozônio. Logo após o suporte de aço inoxidável foi retirado, repetindo-se o procedimento para coleta das amostras pós-teste descrito em 4.8.5.

4.8.9 Análise Microbiológica

Visando quantificar as bactérias aderidas à superfície das amostras, foi realizada a análise microbiológica. Para tanto, cada agulha foi imersa em um tubo Falcon de 15 mL, contendo 10 mL de solução salina estéril. Os tubos foram agitados manualmente por 30 min para que fosse garantida a recuperação do biofilme formado nas agulhas de sutura, imediatamente após esse tempo, foi semeado 100 µL de cada suspensão em superfície de meio de cultura Mueller Hinton Agar, pelo método de espalhamento em placa e incubadas a 37°C por 48h.

4.8.10 Leitura dos resultados

A leitura dos resultados foi feita em 24 h e 48 h após o ensaio para a coleta de dados por meio da contagem de UFC das placas de Petri, utilizando a fórmula:

$UFC = n_{UFC} \times \text{fator}_{\text{diluição}} \times \text{fator}_{\text{volume}}$ [UFC/mL], onde:

UFC: total de Unidades Formadoras de Colônia em UFC/mL

n_{UFC} : número de UFCs contadas nas placas de Petri

fator_{diluição}: considerando a diluição 1:10

fator_{volume}: considerando o volume de 100 µL = 0,1 mL

Desta forma, para o cálculo de UFC/mL do protocolo apresentado, temos:

$$UFC = n_{UFC} \times 10 \times 10$$

$$UFC = n_{UFC} \times 100 \text{ [UFC/mL]}$$

Para o cálculo da porcentagem de redução bacteriana em relação ao Grupo 2 – Controle Positivo (C+), aplica-se a fórmula:

$$\% \text{ Redução} = \left(\frac{UFC (C+) - UFC \text{ Grupo}^*}{UFC (C+)} \right) \times 100$$

Onde, * pode ser 3: Baixa Pressão (BP), 4: BP+O₃30, 5: BP+O₃60 ou 6: O₃60.

4.9 Análise estatística

Para a análise estatística intergrupos foi utilizado o teste One-way ANOVA paramétrico e não pareado, seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações. O programa Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) foi usado com um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta os dados referentes à média e erro padrão da contagem de UFC/mL. Os resultados obtidos demonstram que, conforme esperado, no Grupo Controle Negativo (C-) não houve contagem de UFC/mL. Ao submeter as amostras apenas à Baixa Pressão por 30 min, comparada ao Controle Positivo (C+), partiu-se de 2730 (\pm 545) UFC/mL para 1822 (\pm 253) UFC/mL. Já a associação da Baixa Pressão e Gás Ozônio, Grupos 4 e 5: BP+O₃30 e BP+O₃60, respectivamente, demonstrou ausência de crescimento bacteriano (A/C), independentemente do tempo de exposição das amostras ao Gás Ozônio. Por sua vez, o Gás Ozônio aplicado isoladamente por 30 min e adicionais 30 min de exposição às amostras do Grupo 6 O₃60 reduziu a carga de *Staphylococcus aureus* para 22 (\pm 13) UFC/mL.

Tabela 2: Média e Erro Padrão da contagem bacteriana dos grupos

UFC/mL	Grupos					
	C-	C+	BP	BP+O ₃ 30	BP+O ₃ 60	O ₃ 60
Média	A/C	2730	1822	A/C	A/C	22
Erro Padrão	A/C	545	253	A/C	A/C	13

Contagem UFC/mL dos Grupos C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo; BP: Baixa Pressão por 30 min; BP+O₃30: Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 30 min; BP+O₃60: Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio e O₃60: Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio. A/C: Ausência de Crescimento

A análise estatística intergrupos da contagem bacteriana dos grupos C+, BP, BP+O₃30, BP+O₃60 e O₃60 foi realizada aplicando o teste One-way ANOVA com o pós-teste Student-Newman-Keuls. Os resultados dos testes estatísticos são mostrados na Tabela 3. A redução bacteriana pós-experimento foi significativa, $p < 0,05$, na análise comparativa do Grupo Controle Positivo (C+) com o Grupo Baixa Pressão (BP). Ao comparar o Grupo C+ e BP com os grupos

BP+O₃30, BP+O₃60 e O₃60 obteve-se p<0,001. Já a diferença da redução obtida entre os grupos BP+O₃30, BP+O₃60 e O₃60 não foi significativa.

Tabela 3: Análise estatística com as diferenças significativas entre grupos

Grupos	BP	BP+O ₃ 30	BP+O ₃ 60	O ₃ 60
C+	*	***	***	***
BP		***	***	***
BP+O ₃ 30			ns	ns
BP+O ₃ 60				ns

* p<0,05; ***p<0,001; ns: diferença não significativa

A figura 5 apresenta a Porcentagem de Redução Bacteriana em relação ao Grupo Controle Positivo (C+). Os resultados obtidos demonstram que, ao manter a câmara contendo as agulhas de sutura contaminadas sob vácuo por 30 min, a média de redução bacteriana no Grupo 3 (BP) - Baixa Pressão foi de 33,25%. A associação da Baixa Pressão e Gás Ozônio reduziu em 100% a carga bacteriana, sendo Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 30 min, no Grupo 4: BP+O₃30 e no Grupo 5: BP+O₃60, Baixa Pressão por 30 min, ozonização por 30 min e mais 30 min sob exposição ao Gás Ozônio dentro da câmara. Já para o Grupo 6: O₃60, submetido ao Gás Ozônio isoladamente por 30 min e adicionais 30 min de exposição ao ozônio, a redução foi de 99,19%.

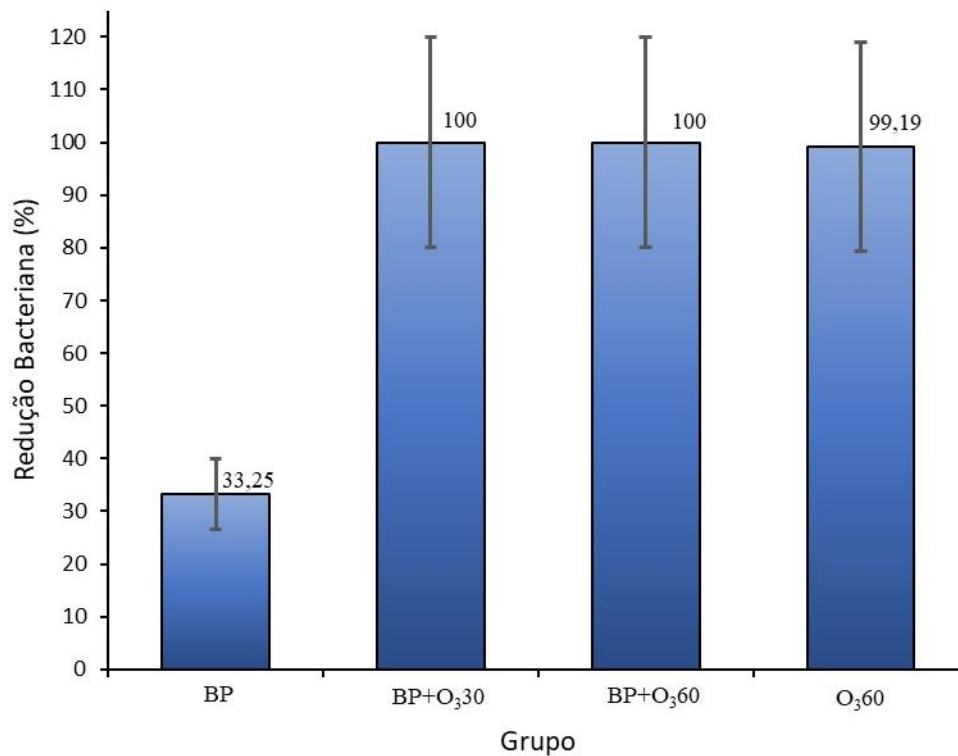


Figura 5: Redução Bacteriana (%) em relação ao Grupo Controle Positivo (C+). Grupos BP: Baixa Pressão por 30 min; BP+O₃30: Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 30 min; BP+O₃60: Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio e O₃60: Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio.

A Figura 6 apresenta a Redução Bacteriana em escala Logarítmica em relação ao Grupo Controle Positivo. Os dados demonstram que não houve redução bacteriana logarítmica no Grupo 3 (BP), o Grupo 4: BP+O₃30 reduziu a carga de *Staphylococcus aureus* em 3 log. A mesma redução logarítmica foi obtida pelo Grupo 5: BP+O₃60. Já para o Grupo 6: O₃60, a redução foi de 2 log.

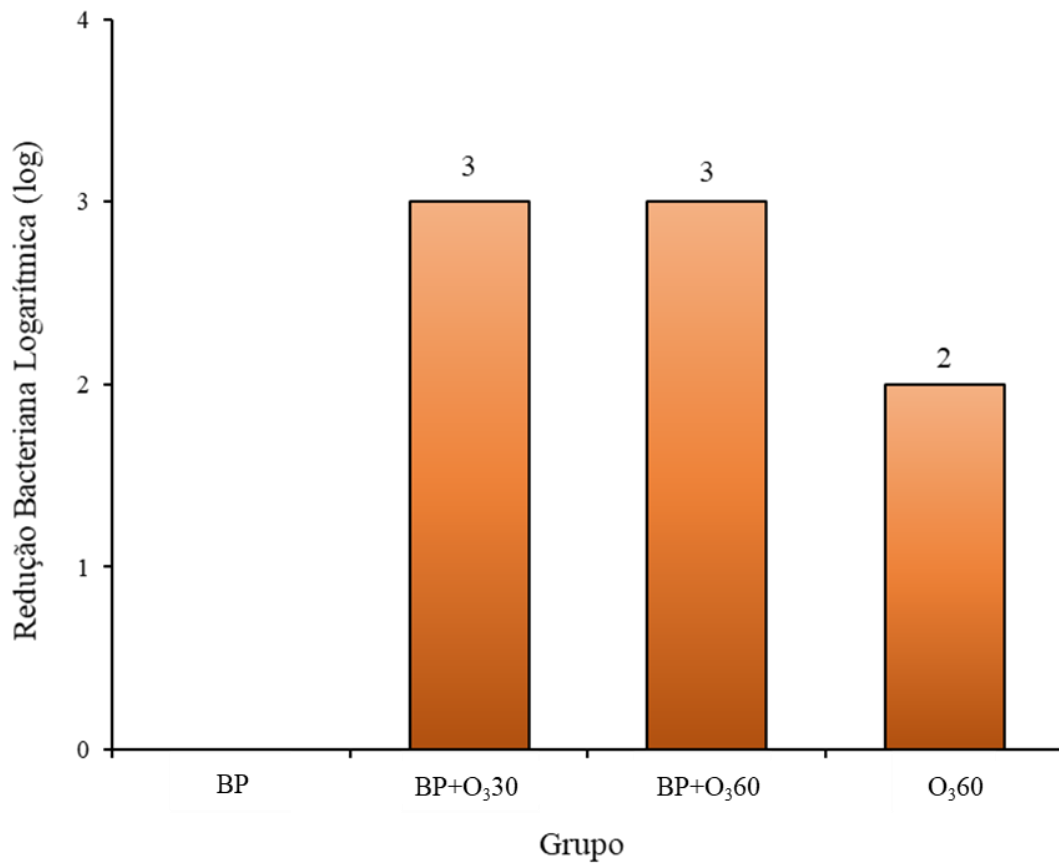


Figura 6: Redução Bacteriana Logarítmica (log) em relação ao Grupo Controle Positivo (C+). Grupos BP: Baixa Pressão por 30 min; BP+O₃30: Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 30 min; BP+O₃60: Baixa Pressão por 30 min e Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio e O₃60: Gás Ozônio por 60 min, sendo 30 min de ozonização e adicionais 30 min de exposição ao ozônio.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo é inovador por trazer à luz, a aplicação da Baixa Pressão associada ao Gás Ozônio na inativação de *S. aureus*, visando promover a desinfecção de agulhas de sutura contaminadas experimentalmente.

O Gás Ozônio já é reconhecidamente um agente microbicida, no entanto não foram encontrados trabalhos especificamente para a esterilização de agulhas de sutura. O potencial do Gás Ozônio na inativação de microrganismos tem sido estudado por diversos autores como Tormin et al. (2016), avaliou o efeito do gás ozônio em bactérias multirresistentes: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, causadoras da infecção hospitalar. Concluiu que nas condições de estudo, o gás ozônio com concentrações de 10 µg/mL, 4 µg/mL e 3 µg/mL por 2 e 4 minutos, aplicado em frascos contendo 500 mL de água estéril bidestilada inoculados com 10⁸ UFC/mL de bactérias a 0,5 na escala de McFarland, tem efeito bactericida sobre as bactérias multirresistentes estudadas e que esse efeito foi proporcional à concentração e ao tempo de exposição, obtendo melhores resultados para a concentração de 10 µg/mL por 4 min.

Em estudo de Lopes et al. (2015) com tubulação corrugada usada por pacientes traqueostomizados, ventilados mecanicamente em UTI, o emprego de gás ozônio mostrou a viabilidade na desinfecção de todos os grupos, com redução de 5 log. O ozônio foi aplicado com concentração de 33 mg/L por 15 min com uma vazão de O₂ de 0,5 L/min.

No protocolo experimental do presente estudo, as agulhas foram inoculadas com 10⁶ UFC/mL de *S. aureus*, concentração que é utilizada para verificar se um processo de esterilização fornece o nível de garantia de esterilidade desejado SAL (Sterility Assurance Level) de 10⁻⁶ UFC/mL (SHINTANI, 2017). Utilizou-se a concentração de 48 mgO₃/L por 30 e 60 min com uma vazão de O₂ de 0,25 L/min, o equivalente à dose de 60 mg/cm² de O₃ e 120 mg/cm² de O₃, respectivamente. Nas condições testadas chegou-se a 3log e 2log de redução bacteriana, respectivamente para a associação de Gás Ozônio e Baixa Pressão, independentemente do tempo de exposição, e do Gás Ozônio

aplicado isoladamente. O protótipo da câmara de vidro utilizada para conter o suporte com as amostras durante a aplicação do Gás Ozônio e Baixa Pressão contribuíram nos resultados positivos ao possibilitar maior contato das agulhas com os dois agentes. Uma câmara semelhante foi utilizada em estudo de Orikasa et al. (2014) na secagem a vácuo, que é um processo no qual o material úmido é seco sob pressão subatmosférica.

O mecanismo de ação do ozônio tem início com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), seguida da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes principalmente na membrana celular. Os peróxidos e as espécies reativas de oxigênio danificam a integridade da parede celular e membrana citoplasmática e os peptídeos solúveis, assim como a glutathione e proteínas em bicamadas lipídicas fornecem alvos potenciais para o ozônio. Este efeito ocorre em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BREIDABLIK, 2019; KOWALSKI, BAHNFLETH, WHITTAM, 1998; MARTINELLI, 2017), muito embora a parede celular destas últimas seja menos espessa, é mais complexa possuindo uma camada extra, a membrana externa (BARBOSA, GOMEZ, TORRES, 2018).

Para a recuperação das UFC/mL de *S. aureus* foi feita a agitação das agulhas de sutura contaminadas experimentalmente dentro de frascos Falcon contendo solução salina estéril. Tal procedimento foi realizado, visando o desprendimento do biofilme formado na superfície das agulhas para posterior análise microbiológica, por espalhamento em placa com volume conhecido de suspensão. Tal procedimento pôde ser observado em outros estudos que corroboram a metodologia empregada (BREIDABLIK, 2019; KOWALSKI, BAHNFLETH, WHITTAM, 1998; MARTINELLI, 2017).

Neste estudo, o vácuo foi utilizado, entre outras razões para retirar o ar de dentro da câmara de vidro, a fim de permitir a inserção de ozônio para fins microbicidas e aumentar a concentração de ozônio, gerado a partir do O₂ medicinal. Uma vez que, a tecnologia de geração de descarga corona a partir do ar nos anos de 1970 produzia apenas 1 a 2% em peso de ozônio, ao alimentar o ozonizador com oxigênio de alta pureza, a concentração dobrava para 2 a 4%, com o avanço tecnológico dos geradores de ozônio, utilizando o O₂ medicinal

como matéria-prima, obtinha-se 6 a 11% no final da década de 1980, tendo o valor aumentado para 14 a 16% no início da década de 1990 (ROUNSAVILLE; RICE, 1996).

O laboratório de Desinfecção e Esterilização, no qual foram realizados os ensaios experimentais com aplicação de Baixa Pressão e Gás Ozônio teve a temperatura monitorada e mantida a 20°C durante todos os experimentos. Nessa temperatura, a pressão de vapor é 2,3 kPa (17,53 mmHg) (NAZEERI et al. 2020; RAKNESS et al., 1996).

A vaporização da água a baixa pressão (LPV) ocorre conforme a pressão do vapor d'água cai abaixo da pressão de saturação (AUGUSTO et al., 2012; SUN, ZHENG, 2006; WANG et al., 2019; ZHU, GENG, SUN, 2019). A secagem a vácuo é um processo no qual o material úmido é seco sob pressão subatmosférica (NIMMOL et al., 2007; ORIKASA et al., 2014). A LPV ocorre conforme a pressão é gradualmente diminuída e se inicia com a evaporação na superfície livre da água e, com o decaimento da pressão abaixo do valor de saturação, que a 20°C é de 2,3 kPa, começa a evaporação instantânea, responsável pela maior parte da produção de vapor (AUGUSTO et al., 2012; RAKNESS, 1996).

Parte importante deste estudo envolve a interpretação da pressão de vapor da água. Neste sentido considera-se um recipiente preenchido até a metade de seu volume com água no estado líquido. Ao vedar o recipiente com tampa, formam-se duas fases uma líquida e outra gasosa, na primeira as moléculas da água estão em contato entre si, sendo que cada uma delas descreve diferentes trajetórias, num movimento Browniano. Há um certo valor de pressão presente na fase gasosa denominado pressão de vapor, o que produz uma taxa de migração das moléculas de água da fase líquida para a gasosa (número de partículas por unidade de tempo), que se iguala no caso da transferência das moléculas da fase gasosa para a líquida. Na fase gasosa cada molécula de água está isolada com velocidade em direção aleatória, e continuamente chocando-se com outras moléculas e a parede do recipiente. Quando ocorre a diminuição da pressão por ação da bomba de vácuo, logo

atinge-se a pressão de 2,3 kPa (17,53 mmHg), que é a pressão de vapor a 20°C (RAKNESS et al., 1996).

Quando se atinge um valor abaixo do limite de referência da pressão de vapor da água, a taxa de migração das moléculas da fase líquida para a gasosa aumenta significativamente, se esta pressão reduzida for mantida pela bomba, continuamente acarretará a diminuição do volume da fase líquida (AUGUSTO et al., 2012; PAL et al., 2012; RAKNESS, 1996).

De forma análoga, no protocolo experimental, tem-se a câmara fechada e vedada, na qual estão as agulhas de sutura com biofilme bacteriano, formado a partir da contaminação experimental com *S. aureus*, por imersão em suspensão bacteriana e secas em contato com o ar. Quando submetidos e mantidos a uma pressão abaixo do valor de 2,3 kPa na temperatura de teste de 20°C dentro da câmara, ocorre a migração das moléculas de água presentes no biofilme para a fase gasosa, ocorrendo a vaporização da água à Baixa Pressão. Neste sentido, a água presente no biofilme bacteriano diminuirá significativamente, tornando o ambiente inóspito para estas bactérias, inativando, desta forma, um número expressivo delas.

Sabendo-se que o *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, unicelular e que seu citoplasma é composto de 70% de água, analogamente ao processo LPV, ao submeter as agulhas de sutura contaminadas experimentalmente a uma pressão de 3,9 Pa obtida com a bomba de vácuo utilizada nos grupos 3 a 5, bem abaixo de 2,3 kPa a 20°C, a partir da qual ocorre a evaporação instantânea da água, pode ter provocado o aumento da taxa de difusão do vapor d'água no interior da câmara, ou seja, migração da água do citoplasma bacteriano e sua vaporização, acarretando na desidratação expressiva dos microrganismos.

Desta forma, a Baixa Pressão pode ter contribuído na inativação de parte da carga de *S. aureus*, sobretudo nos grupos 4 e 5 em que atua em conjunto com o Gás Ozônio, obtendo 3log de redução da carga bacteriana. No entanto, a Baixa Pressão aplicada isoladamente por 30 min apresentou redução bacteriana de 33,25%, o que indica necessidade de novos testes com maior tempo de aplicação para verificação de incremento nos resultados e, portanto, baseando-

se nos parâmetros do estudo, seria recomendada como adjuvante do Gás Ozônio na inativação de *S. aureus*.

De acordo com a definição da ANVISA (2010), a agulha de sutura é considerada um artigo crítico por ser utilizado em procedimentos de alto risco, os quais penetram tecidos ou órgãos, requerem esterilização para uso. Dois dos métodos mais usuais na esterilização de agulhas de sutura são por óxido de etileno (EtO) e Radiação Gama, porém este método de esterilização já foi considerado a última escolha devido ao resíduo de gás tóxico gerado (SHINTANI, 2017; GIMENO et al., 2018). Já a Radiação Gama necessita de grandes instalações, disponibilização de EPI's adequados para redução de riscos ocupacionais, cumprimento da legislação ambiental, fazendo com que o custo deste procedimento se torne elevado (SINGH et al., 2016).

Diante do exposto, este foi um estudo preliminar em que foi verificada a viabilidade do uso do Gás Ozônio, da Baixa Pressão e sua associação na desinfecção de agulhas de sutura para posterior estudo de comprovação de eficácia esterilizante. Para tal, seria necessário testar, além do *S. aureus*, outros microrganismos para avaliação da atividade antimicrobiana esterilizante, como: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Mycobacterium massiliense* (ANVISA, 2010), podendo ainda fazer uso como indicador biológico, os esporos de *Geobacillus stearothermophilus* para comprovação da esterilização pós-teste, conforme estudo de De Souza Botelho-Almeida et al. (2018) sobre esterilização de artigos médicos com gás ozônio.

Estudos futuros, utilizando os equipamentos disponíveis, poderão ser realizados com menores tempos de exposição das agulhas ao Gás Ozônio aplicado isoladamente na inativação de *S.aureus* e dos outros microrganismos mencionados, visando a redução do tempo de ensaio e, conseqüentemente, redução da dose de O₃, acarretando em redução nos custos de energia elétrica e consumo de O₂. Outro ponto seria a associação das duas técnicas, que também poderia ser testada com menores tempos de exposição à Baixa Pressão e Gás Ozônio, visando um menor tempo de análise. Por outro lado, o tempo de submissão das amostras à Baixa Pressão, aplicada isoladamente, poderia ser aumentado para verificar se há incremento na eficácia bactericida.

Para implementar, em escala industrial, um processo de esterilização automatizado, nas condições e parâmetros do estudo, as embalagens das agulhas semiabertas deverão estar contidas numa câmara submetida à Baixa Pressão, através do acionamento de uma bomba de vácuo por 30 min, seguida da ozonização por 30 min, aplicando a dose de 60 mg/cm² de O₃. Decorrido esse tempo, uma seladora automatizada acoplada à câmara de vácuo, sem contato manual, seria acionada para fechar e vedar as embalagens, sendo importante ressaltar que o ozônio residual dentro das embalagens ficará em contato com as agulhas. Por fim, uma esteira as conduziria para serem acondicionadas na embalagem final. O processo, poderia ainda ser otimizado, disponibilizando um gerador com maior capacidade de produção de ozônio, o que impactaria, sobretudo na redução do tempo de exposição necessário para a esterilização de agulhas de sutura, tornando o procedimento descrito uma alternativa bastante viável à esterilização por Óxido de Etileno e Radiação Gama.

7 CONCLUSÃO

O estudo realizado apresentou a inovação de associar a Baixa Pressão ao Gás Ozônio na inativação de *Staphylococcus aureus*, mostrando ser eficaz na desinfecção de agulhas de sutura contaminadas experimentalmente.

Ao comparar as diferentes técnicas utilizadas na inativação do *S. aureus* foi possível verificar que a maior eficácia foi obtida com a associação do Gás Ozônio e Baixa Pressão, independentemente do tempo de exposição ao O₃, com reduções de 3 log na carga de *S. aureus*. Efeito similar obteve o Gás Ozônio, quando utilizado isoladamente por 60 min, com 2 log de redução. Já a aplicação da Baixa Pressão isoladamente obteve 33,25% de redução da carga de *S.aureus*.

Nas condições do estudo o protocolo ideal para inativação de *Staphylococcus aureus* é o que foi estabelecido para o Grupo 4, BP+O₃30, onde as amostras de agulhas de sutura contaminadas experimentalmente foram submetidas à Baixa Pressão por 30 min e ao Gás Ozônio por 30 min com a dose de 60 mg/cm² de O₃.

No presente estudo foi comprovada a eficácia do protocolo experimental na desinfecção de agulhas de sutura contaminadas experimentalmente com *S. aureus*, através do Gás Ozônio e de sua associação à Baixa Pressão. Os resultados ora apresentados servirão de suporte para estudos posteriores que visem a comprovação de eficácia na esterilização das agulhas de sutura por estes agentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, A.; MACORRA, J.C.; GOVINDJEE, S.; PETERS, O.A. **Effect of Gamma-Ray Sterilization on Phase Transformation Behavior and Fatigue Resistance of Contemporary Nickel-Titanium Instruments**. Clin Oral Investig, v. 24, p. 3113-3120, 2020. doi: 10.1007/s00784-019-03185-4.

AUGUSTO, C. M. et al. **A Mathematical Model describing the two Stages of Low-Pressure-Vaporization of Free Water**. J Food Eng, v. 112, p. 274-281, 2012.

BAIRD-PARKER, A. C. **The Staphylococci: an introduction**. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement, 1S-8S, 1990.

BARBOSA, H. R.; GOMEZ, J. G. C.; TORRES, B. **Microbiologia básica: Bacteriologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Módulo IV: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Módulo V: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. ANVISA. **RDC Nº 35, DE 16 DE AGOSTO DE 2010**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. Publicada em DOU nº 158, de 18 de agosto de 2010.

BOCCI, Velio. **Ozone a New Medical Drug**. 2.ed. Netherlands: Springer, 2011.

BREIDABLIK, H. J et al. **Ozonized Water as an Alternative to Alcohol-Based Hand Disinfection**. Journal of Hospital Infection, v. 102, p. 419-424, 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). **Staphylococcus aureus in Healthcare Settings**. Última revisão: 17/01/2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>. Acesso em: 14/03/2021.

DE SOUZA BOTELHO-ALMEIDA, Túlia et al. **Evaluating the potential, applicability, and effectiveness of ozone sterilization process for medical devices**. Journal of Pharmaceutical Innovation, v. 13, p. 87-94, 2018.

FOSTER, T. J.; GEOGHEGAN, J. A. **Staphylococcus aureus**. Molecular Medical Microbiology, p. 655-674, 2015.

GIMENO, P. et al. **Identification and Quantification of Ethylene Oxide in Sterilized Medical Devices using Multiple Headspace GC/MS Measurement.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 158, p. 119-127, 2018.

HARRELL, C. R.; DJONOV, V.; FELLABAUM, C; VOLAREVIC, V. **Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin.** Int. J. Med. Sci., v. 15, p. 274-279, 2018. doi: 10.7150/ijms.22644.

HUDSON, J. B.; SHARMA, Manju; VIMALANATHAN, Selvarani. **Development of a Practical Method for using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent.** Ozone: science & engineering, v. 31, n. 3, p. 216-223, 2009.

INCROPERA, F. P.; DEWITT, D. P. **Fundamentals of Heat and Mass Transfer.** Sixth Edition. John Wiley & Sons, 2007.

JUNQUEIRA, L C. U.; CARNEIRO, J.. **Histologia Básica.** 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KOWALSKI, W. J.; BAHNFLETH, W. P.; WHITTAM, T. S. **Bactericidal Effects of High Airborne Ozone Concentrations on Escherichia coli and Staphylococcus aureus.** Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association, v. 20, p. 205-221, 1998. DOI: 10.1080/01919519808547272

KUMAR, Surinder. **Textbook of Microbiology.** New Delhi: JP Medical, 2012.

LOPES, M.S. et al. **Disinfection of Corrugated Tubing by Ozone and Ultrasound in Mechanically Ventilated Tracheostomized Patients.** Journal of Hospital Infection v. 90, p. 304-309, 2015.

LUTGENS, F.K.; TARBUCK, E.J. **The Atmosphere: an introduction to Meteorology.** Prentice Hall, 1989.

MARSON, R. F. et al. **Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes.** Ozone: Science & Engineering, v. 38, p. 346-351, 2016.

MARTINELLI, M. et al. **Water and Air Ozone Treatment as an Alternative Sanitizing Technology.** J Prev Med Hyg, v. 58, p. E48-E52, 2017.

MEGAHED, A. et al. **The Microbial Killing Capacity of Aqueous and Gaseous Ozone on Different Surfaces Contaminated with Dairy Cattle Manure.** PLoS ONE, v. 13, p. e0196555, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196555>.

MEHLMAN, M. A.; BOREK, C.. **Toxicity and Biochemical Mechanisms of Ozone.** Environmental Research, v. 42, p. 36-53, 1987.

MOREIRA, Livia Helena et al. **Effect of Ozone as Acaricide: Action of the Ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick Rhipicephalus sanguineus sensu lato.** *Ozone: Science & Engineering*, v. 40, p. 183-190, 2018.

MOREIRA FONSECA, P. et al. **Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound.** *Ozone: Science & Engineering*, v. 37, p. 85-89, 2015.

NAZEERI, A. I.; HILBURN, I. A.; WU, D. A., MOHAMMED, K. A.; BADAL, D. Y.; CHAN, M. H. W.; et al. **Ethanol-Drying Regeneration of N95 Respirators.** MEDRXIV 2020.

NIMMOL, C. et al. Drying of banana slices using combined low-pressure superheated steam and far-infrared radiation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 624-633, 2007.

OGSTON, A. **Ueber Abscesse.** *Arch klin Chir*, v. 25, p. 588- 600, 1880.

ORIKASA, T et al. Impacts of hot air and vacuum drying on the quality attributes of kiwifruit slices. **Journal of Food engineering**, v. 125, p. 51-58, 2014.

PAL, G. et al. **Removal of Water from Unbaked Vacuum System.** In: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, p. 012045, 2012.

PORTO, K. M. BG; NAPOLITANO, C. M.; BORRELY, S. I. **Gamma Radiation Effects in Packaging for Sterilization of Health Products and their Constituents Paper and Plastic Film.** *Radiation Physics and Chemistry*, v. 142, p. 23-28, 2018.

RAKNESS, K. et al. **Guideline for Measurement of Ozone Concentration in the Process Gas from an Ozone Generator.** *Ozone: Science & Engineering*, v.18, p. 209-229, 1996.

ROUNSAVILLE, J.; RICE, R. G. **Evolution of Ozone for the Bleaching of Paper Pulps.** *Ozone: Science & Engineering*, v. 18, p. 549-566, 1996.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: Hat Clinicians Need to Know.** *Clinical infectious diseases*, v. 39, n. 5, p. 702-709, 2004.

RUTALA, William Anthony; WEBER, David Jay. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.** 2008.

RUTALA, William A.; WEBER, David J. **Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: An Overview and Current Issues.** *Infectious Disease Clinics*, v. 30, n. 3, p. 609-637, 2016.

SHINTANI, H. **Ethylene Oxide Gas Sterilization of Medical Devices**. Biocontrol Science, v. 22, p. 1-16, 2017.

SINGH, R. et al. **Radiation Sterilization of Tissue Allografts: A Review**. World J Radiol, v. 8, p. 355-369, 2016.

SUN, Da-Wen; ZHENG, L.. **Vacuum Cooling Technology for the Agri-Food Industry: Past, Present and Future**. Journal of Food Engineering, v. 77, p. 203-214, 2006.

TORMIN, S. C. et al. **Analysis of Bactericidal Effect of Ozone on Multi-Resistant Bacteria**. Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, v. 61, p. 138-141, 2016

VAN LEEUWEN, J. **Proposed OS&E Requirement: Measuring Ozone Dosage**. Ozone: Science & Engineering, v. 37, n. 2, p. 191-192, 2015.

WANG, C. et al. **Study on Water Flash Evaporation under Reduced Pressure**. International Journal of Heat and Mass Transfer, v. 131, p. 31-40, 2019.

ZHU, Z.; GENG, Y.; SUN, Da-Wen. **Effects of Operation Processes and Conditions on Enhancing Performances of Vacuum Cooling of Foods: A Review**. Trends in Food Science & Technology, v. 85, p. 67-77, 2019.