

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

Resistência de Microrganismos Presentes em Ambiente Hospitalar
e Sistema de Purificação de Água e Uso da Proteína Verde
Fluorescente (GFP) como Potencial Indicador Biológico

Priscila Gava Mazzola

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Vessoni Penna
Co-orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

São Paulo
2006

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

Resistência de Microrganismos Presentes em Ambiente Hospitalar
e Sistema de Purificação de Água e Uso da Proteína Verde
Fluorescente (GFP) como Potencial Indicador Biológico

Priscila Gava Mazzola

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Vessoni Penna
Co-orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

São Paulo
2006

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

M478r Mazzola, Priscila Gava
Resistência de microrganismos presentes em ambiente hospitalar e sistema de purificação de água e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como potencial indicador biológico / Priscila Gava Mazzola. -- São Paulo, 2006.
136p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vessoni Penna, Thereza Christina
Co-orientador: Pessoa Junior, Adalberto


1. Biotecnologia 2. Infecção hospitalar 3. Água : Contaminação : Saúde pública I. T. II. Vessoni Penna, Thereza Christina, orientador III. Pessoa Junior, Adalberto, co-orientador.

620.8 CDD

Priscila Gava Mazzola

Resistência de Microrganismos Presentes em Ambiente Hospitalar
e Sistema de Purificação de Água e Uso da Proteína Verde
Fluorescente (GFP) como Potencial Indicador Biológico

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor



Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Vessoni Penna
orientador/presidente

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.
1º. examinador

Prof.^a Dr.^a Inês Conceição Roberto
2º. examinador

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho
3º. examinador

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
4º. examinador

São Paulo, 1º de Setembro de 2006.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Priscila Gava Mazzola no Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 1 dias do mês de setembro de 2006, realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Priscila Gava Mazzola, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica, intitulada:

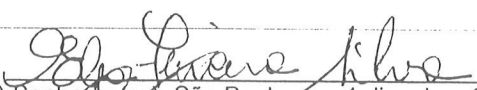
"Resistência de microrganismos presentes em ambiente hospitalar e sistema de purificação de água e uso de proteína verde fluorescente (GFP) como potencial indicador biológico"

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

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Thereza Christina Vessoni Penna	Presidente	FCF - USP	APROVADA
Elias Basile Tambourgi	Titular	UNICAMP - Externo	APROVADO
Adalberto Pessoa Junior	Titular	FCF - USP	APROVADA
Inês Conceição Roberto	Titular	FAENQUIL - Externo	APROVADO
Pedro de Alcantara Pessoa Filho	Titular	EP - USP	APROVADO

Resultado Final:
Parecer da Comissão Julgadora *

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Elza Ferreira Silva, , Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 1 dias do mês de setembro de 2006.

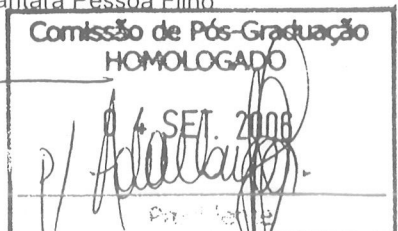

Elias Basile Tambourgi


Adalberto Pessoa Junior


Inês Conceição Roberto


Pedro de Alcantara Pessoa Filho


Thereza Christina Vessoni Penna
Orientador(a)



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

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

“Nasci para o mundo uma criança frágil e dependente, mas o Teu Anjo, abrindo suas asas brancas, protegeu meu berço. Desde aquela época, até hoje, o Teu amor brilha em todos meus caminhos, me dirigindo maravilhosamente para a luz da eternidade. Agradeço e clamo com todos que Te conhecem:

Glória a Ti que me deste a vida; Glória a Ti que me mostraste a beleza ao meu redor; Glória a Ti que abriste diante de mim o céu e a terra como um livro eterno de sabedoria; Glória a Ti por Tua eternidade no meio do mundo; Glória a Ti pelas misericórdias visíveis e invisíveis; Glória a Ti por cada passo que dou na vida, por cada momento de felicidade; Glória a Ti, Senhor, para sempre!”

(Ikos)

*Aos meus amados pais, Evaristo e Márcia,
por terem sempre guiado meus passos e me
ensinado a escolher. Vocês são minha fonte de
inspiração e alegria. Sob o vosso olhar posso
caminhar segura.*

*Aos meus irmãos e grandes amigos, Patrícia e
William. A amizade e amor incondicional que
temos nos faz cada vez mais próximos. Sem o
incentivo de vocês as lutas seriam sempre mais
árduas e as vitórias sempre menos festejadas.*

*Ao João, pelo incentivo, apoio, carinho e amor
de todos os dias, como se fossem sempre o
primeiro. Obrigada por dividir a vida comigo.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Thereza Christina Vessoni Penna, pelo apoio, dedicação e oportunidades durante estes quase dez anos de parceria. Minha admiração e gratidão. À amiga, Chris, pelo carinho, atenção e amizade incondicionais. Muito obrigada por me ajudar a encontrar meu caminho e minha vocação.

Ao Professor Doutor Adalberto Pessoa Jr., pela confiança, estímulo e amizade.

To Professor Daniel Blankschtein, for having me in the DB group for 18 months, for all the help and support, I learned a lot from you and I will be always thankful for the time I spent in your group.

À Professora Doutora Carlota Rangel-Yagui, sem seu apoio muitas realizações teriam sido inatingíveis.

Aos Professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

À todos os Funcionários do FBT, em especial à Elza, Mirian e Juarez.

Aos funcionários colegas de laboratório Cândida, Gledson, Graça, Irene, Marilene, Ricardo, e Sônia.

Aos queridos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Elaine e Jorge, agradeço o carinho, esforço e eficiência. É muito bom vê-los sempre animados e dispostos, admiro a maneira como trabalham.

Aos colegas e amigos pós-graduandos e pós-doutorandos André, Angela, Carol, Fábio, Laura, Luciana, Luiz, Marina, Pérola e Renato.

To the DB Group, Arthur, Brian, Henry, Isaac, Joe, Jonathan, Sash, Srinii, I had a wonderful time with you, and you will always be part of great memories, hope our friendship lasts long.

Às "crianças" Deise, Gabriel, Hélio, Juli, Lari, Márcio, Mari, Pedrão, Teté, Thaís.

Aos meus novos e velhos amigos Alê, Alex, Angela, Arthur, Carlota, Carô, Carol, Carol Dizioli, Dami, Glau, Laura, Letícia, Marie, Paulinha, Pérola, Pri, Rê, Ronald e Tati. Todos vocês, cada uma a sua maneira e a seu tempo foram muito importantes!

À CAPES, CNPq, FAPESP e MIT pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO I	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1.1 Ambiente Hospitalar	6
1.2 Sistemas de Tratamento de Água	16
1.3 A Proteína Verde Fluorescente	21
1.4 Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	22
CAPÍTULO II	28
2.1 INTRODUÇÃO	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.2.1 Material	33
2.2.2 Preparação do inóculo	33
2.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	34
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
2.4 CONCLUSÕES	44
CAPÍTULO III	46
3.1 INTRODUÇÃO	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.2.1 Material	49
3.2.2 Preparação do inóculo	50
3.2.3 Tempo de Redução Decimal (valor D)	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.4 CONCLUSÕES	60
CAPÍTULO IV	61
4.1 INTRODUÇÃO	61
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.2.1 Material	63

4.2.2 Métodos.....	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.4 CONCLUSÕES	70
CAPÍTULO V.....	72
5.1 INTRODUÇÃO	72
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	75
5.2.1 Material.....	75
5.2.2 Métodos.....	76
5.2.3 Tempo de Redução Decimal (valor D)	77
5.3 RESULTADOS	78
5.4 DISCUSSÃO	86
5.5 CONCLUSÕES	88
CAPÍTULO VI.....	90
6.1 INTRODUÇÃO	90
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	94
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
6.4 CONCLUSÕES	104
CAPÍTULO VII.....	107
7.1 INTRODUÇÃO	107
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	111
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
7.4 CONCLUSÕES	120
CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS.....	124
Anexo - Artigos já publicados e aceitos para publicação	136

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1.	Curva Binodal Experimental de uma solução aquosa de C ₁₀ E ₄ obtida por Liu <i>et al.</i> (1996).	26
FIGURA 2.1.	Esquema ilustrativo do método das diluições sucessivas.	35
FIGURA 3.1.	Representação do ensaio de determinação do tempo de redução decimal (Valor D).	52
FIGURA 4.1.	Fluxograma do sistema de tratamento de água estudado, com os treze pontos de amostragem representados.	64
FIGURA 5.1.	Fluxograma do sistema de tratamento de água estudado, com os treze pontos de amostragem representados.	73
FIGURA 6.1.	Curva de calibração da proteína GFP padrão, correlacionado intensidade de fluorescência e concentração de proteínas, $y=103,61x-134,64$ ($R^2=0,9859$), em que y representa intensidade de fluorescência e x concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$).	94
FIGURA 6.2.	Comparação entre os valores D nas soluções de cloro tamponadas com e sem agitação à 25°C. As concentrações de cloro ensaiadas foram (i) 7 ppm em tampão acetato (pH 5,1), (ii) 50, 60, 70, 80, 90 e 100 ppm e tampão fosfato (pH $7,15\pm 0,08$).	98
FIGURA 6.3.	Comparação entre a intensidade de fluorescência da proteína GFP em contato com 90 ppm de cloro em tampão fosfato ($7,15\pm 0,08$) com (■) e sem (◇) agitação à 25°C. As linhas de tendência representando a perda de fluorescência com e sem agitação foram, respectivamente, $y=-0,0002x+2,835$ ($R^2=0,99$) e $y=-6x10^{-5}x+2,832$ ($R^2=0,97$), em que y representa o logaritmo da intensidade, e x representa tempo (min).	99
FIGURA 6.4.	Comparação dos valores D para soluções cloradas com tampão fosfato (184 ppm de cloro livre) em pH 6 e 7.	103
FIGURA 7.1.	Diagrama de fases para o sistema C ₁₀ G ₁ /tampão na presença e ausência de homogeneizado celular. Os quadrados (■) e triângulos (▲) cheios representam pontos de névoa determinado experimentalmente para a fase rica e pobre em micelas, respectivamente. Os círculos (○), quadrados (□) e cruzeiros (x) representam pontos de névoa determinados experimentalmente para o sistema C ₁₀ G ₁ /tampão na presença de homogeneizado celular diluído 5x, 10x e 40x, respectivamente. O erro experimental para os pontos de névoa é de 0,1°C (contidos nos símbolos devido à escala). A linha cheia (—) e linha pontilhada (- -) representam a melhor curva contendo os pontos determinados experimentalmente na ausência de lisado celular (LAM <i>et al.</i> , 2004). A região de duas fases coexistentes, de uma fase homogênea e a linha de amarração (29°C) estão indicadas.	114

- FIGURA 7.2.** Coeficientes de partição da proteína alvo CBM9-GFP ($K_{\text{CBM9-GFP}}$) determinados experimentalmente em três níveis distintos de diluição (40x, 10x e 5x). O valor de $K_{\text{CBM9-GFP}}$ corresponde à partição da proteína pura (LAM *et al.*, 2004), nas mesmas condições experimentais (29°C, 5% C₁₀G₁). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para as medidas. **117**
- FIGURA 7.3.** Coeficientes de partição das proteínas provenientes do lisado celular (K_{HSP}) determinados experimentalmente em três níveis distintos de diluição (40x, 10x e 5x), nas mesmas condições experimentais (29°C, 5% C₁₀G₁). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para as medidas. **118**

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Concentração inibitória mínima (CIM) de agentes químicos ensaiados frente a suspensões de bactérias estudadas.	43
Tabela 3.1.	Tempo de redução decimal (valores D) para as bactérias estudadas frente às diferentes soluções de agente químicos. Estão relacionadas as concentrações dos agentes químicos, número de sobreviventes e valores D.	58
Tabela 4.1.	Microrganismos isolados nos treze pontos de amostragem após identificação em quantidade e porcentagem (%) do total.	66
Tabela 4.2.	Valores de concentração inibitória mínima para os principais microrganismos isolados e identificados no sistema de tratamento de água frente a agentes químicos empregados em diversas etapas da purificação da água.	69
Tabela 5.1.	Tempo de redução decimal (valor D), número de ciclos logaritmo reduzidos (n) para o período de aplicação de cada solução desinfetante e bactéria testada. O tempo de exposição para $n=6$ ($6\log_{10}$) para cada agente químico e bactéria. A tabela está organizada com base no agente químico (5.1.1. - 5.1.7.).	80
Tabela 6.1.	Concentração inibitória mínima (CIM) determinada pela perda de fluorescência nos 30 segundos de contato inicial e 10 minutos de exposição (tempo máximo de exposição) em água (WFI) e tampão fosfato (pH 6 e 7).	98
Tabela 6.2.	Valores D obtidos das curvas de redução de fluorescência (\log_{10}) para exposição de GFP às soluções cloradas de tampão fosfato (pH $6,86\pm 0,21$) com agitação. A concentração inicial de GFP foi de $8,73\pm 0,50$ $\mu\text{g/mL}$.	100
Tabela 6.3.	Valores D obtidos das curvas de redução de fluorescência (\log_{10}) para exposição de GFP às soluções cloradas de tampão fosfato (pH $7,15\pm 0,23$) com agitação. A concentração inicial de GFP foi de $8,73\pm 0,50$ $\mu\text{g/mL}$.	103

RESUMO

Devido ao número crescente de surtos de infecção hospitalar, torna-se proeminente o estabelecimento de um programa de sanitização que liste os agentes químicos a serem empregados e o modo de aplicação mais efetivo. Processos de desinfecção também são relevantes em sistemas de tratamento de água (em indústrias farmacêuticas e centros de saúde) para que a qualidade da água seja assegurada e atenda os parâmetros estabelecidos, evitando proliferação microbiana. Validação da eficácia de descontaminação é uma tarefa ao mesmo tempo importante e desafiadora. Indicadores biológicos são sistemas ou moléculas que detectam atividade biológica, permitindo a validação de processos de descontaminação ou desinfecção. O indicador biológico pode ser uma suspensão de microrganismos específicos (sistema biológico) com resistência definida a um determinado processo de descontaminação. Enzimas e proteínas também têm sido empregadas como indicadores biológicos para avaliar a eficácia de processos industriais. A proteína verde fluorescente (GFP) tem sido sugerida como potencial indicador biológico para tratamentos de desinfecção, devido facilidade de sua detecção por espectrofluorimetria ou por inspeção visual. Para estudar e comparar o comportamento dos microrganismos selecionados e da GFP foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e tempo de redução decimal (valor D). A CIM capaz de reduzir o *bioburden* inicial ($>8\log_{10}$) foi: 59 – 156 mg/L de quartenários de amônia; 63 – 10000 mg/L de clorexidina, 1375 – 3250 mg/mL de glutaraldeído, 39 – 246 mg/L de formaldeído, 43750 – 87500 mg/L de álcool etílico 1250 – 6250 mg/L de polivinilpirrolidona iodo, 150 – 4491 mg/L de compostos liberadores de cloro, 469 -2500 mg/L de peróxido de hidrogênio e 2310 – 18500 mg/L de ácido peracético. *A. calcoaceticus* apresentou resistência à maioria dos agentes químicos testados, seguido de *E. cloacae* e *S. marcescens*. No sistema de purificação de água os resultados para *Pseudomonas aeruginosa* foram: (i) 0,5% de ácido cítrico, D = 3,8 min; (ii) 0,5% de ácido clorídrico, D = 6,9 min; (iii) 70% álcool etílico, D = 9,7 min; (iv) 0,5% bissulfito de sódio, D = 5,3 min; (v) 0,4% de hidróxido de sódio, D = 14,2 min; (vi) 0,5% de hipoclorito de sódio, D = 7,9 min; (vii) mistura de peróxido de hidrogênio (2,2%) e ácido peracético (0,45%), D = 5,5 min. GFP testada frente a soluções cloradas (com diferentes valores de pH e concentração) resultou em diminuição da fluorescência, sendo mais evidente em concentrações de cloro maiores que 150 ppm, com valores D entre 1,3 - 1,7 min. Em soluções de cloro em tampão fosfato (pH=7,15±0,08), a proteína manteve sua estrutura em contato com soluções 52-94 ppm de cloro. Frente a 110 ppm de cloro a estabilidade da proteína foi reduzida 10 vezes. A proteína GFP se mostrou um marcador fluorescente apropriado para monitorar eficácia de desinfecção. Para ser empregada como indicador biológico a proteína deve ser purificada através de um método de fácil ampliação de escala e com boa relação custo benefício, com este intuito o sistema micelar de duas fases aquosas foi estudado, e a proteína GFP foi parcialmente recuperada do homogeneizado celular de *E. coli*, outros contaminantes presentes no meio foram removidos na mesma etapa. A demonstração de que é possível se extrair uma biomolécula alvo utilizando ligantes de afinidade representa um passo importante no desenvolvimento de um método eficaz de separação que poderá ser utilizado na purificação de outras biomoléculas.

ABSTRACT

Due to the growing number of outbreaks of infection in hospital and nurseries, it becomes essential to set up a sanitation program that indicates that the appropriate chemical agent was chosen for application in the most effective way. Disinfection processes are also relevant in water purification systems (in pharmaceutical industries and in health environments) to assure water quality, meeting ionic and organic chemical standards, and avoiding microbial proliferation. Validating the effectiveness of decontamination and disinfection is an important and often challenging task. A biological indicator is a system or a molecule that enables the detection of biological activity, and as such, permits the validation of decontamination or disinfection treatments. The biological indicator can be a specific microorganism suspension (microbiological test system) with a defined resistance to a particular decontamination treatment. Enzymes and proteins have also been used as biological indicators to evaluate the immediate efficacy of industrial procedures, such as blanching, pasteurization, and disinfection treatments, as well as to monitor the satisfactory preservation of a product subjected to disinfection or sterilization. Green fluorescent protein (GFP) has been proposed as an ideal choice for a protein-based biological indicator for use in the validation of decontamination or disinfection treatments. In order to study and compare microorganism (in hospital infections outbreaks and isolated from the water purification system) and protein behavior, microorganisms were submitted to minimal inhibitory concentration (CIM) and decimal reduction time determination (D value). The CIM intervals, which reduced bacteria populations over $8\log_{10}$, were: 59 to 156 mg/L of quaternarium ammonium compounds (QACs); 63 to 10000 mg/L of chlorhexidine; 1375 to 3250 mg/L of glutaraldehyde; 39 to 246 mg/L of formaldehyde; 43750 to 87500 mg/L of ethanol; 1250 to 6250 mg/L of iodine in polyvinyl-pyrrolidone complexes, 150 to 4491 mg/L of chlorine-releasing-agents (CRAs); 469 to 2500 mg/L of hydrogen peroxide; and, 2310 to 18500 mg/L of peracetic acid. Chlorhexidine showed non inhibitory activity over germinating spores. *A. calcoaceticus* showed resistance to the majority of the agents tested, followed by *E. cloacae* and *S. marcescens*. In the water purification system the results were for *P. aeruginosa* into: (i) 0.5% citric acid, D = 3.8 min; (ii) 0.5% hydrochloric acid, D = 6.9 min; (iii) 70% ethanol, D = 9.7 min; (iv) 0.5% sodium bisulfite, D = 5.3 min; (v) 0.4% sodium hydroxide, D = 14.2 min; (vi) 0.5% sodium hypochlorite, D = 7.9 min; (vii) mixture of hydrogen peroxide (2.2%) plus peracetic acid (0.45%), D = 5.5 min. GFP was challenged with chlorine solutions (different pH and chlorine concentrations) and its fluorescence decreased abruptly on contact with chlorine in concentrations greater than 150 ppm, with D-values between 1.3 min (147 ppm chlorine) and 1.7 min (183 ppm chlorine). In phosphate buffered chlorine solutions (pH=7.15±0.08), GFP maintained its structure between 52-94 ppm of chlorine, but protein stability decreased 10-fold when exposed to 110 ppm chlorine. GFP performed as a suitable fluorescent marker for monitoring disinfection effectiveness. To be used as a biological indicator GFP has to be purified through a potentially scalable and cost-effective way to purify the recombinant protein, produced by *E. coli*. The method studied was two-phase aqueous micellar system, and GFP was partially recovered from a clarified *E. coli* cell lysate. Other contaminating proteins were simultaneously removed. The demonstration of proof-of-principle of the direct affinity-enhanced extraction of CBM9-GFP from the cell lysate represents an important first step towards developing a cost-effective separation method for GFP, and more generally, for other proteins of interest.

INTRODUÇÃO

O indicador biológico (IB) é uma ferramenta de fácil manipulação que permite a monitoração e validação dos processos de esterilização e desinfecção. A otimização destes processos depende da correta e criteriosa escolha, aplicação e observação das características peculiares de cada agente químico e dos fatores interferentes (ISO 14937, ISO 11134, GRAHAM E BORIS, 1993).

Esporos de *Bacillus stearothermophilus* são considerados convenientes indicadores biológicos na esterilização por calor úmido, à temperatura de referência de 121°C. Esporos de *Bacillus subtilis* são empregados nos processos de esterilização por calor seco e óxido de etileno.

O número final de microrganismos sobreviventes ao processo de esterilização, representa o efeito do processo. A destruição térmica de uma população homogênea pode ser representada por um modelo de curva semi-logarítmica de sobreviventes em relação ao tempo de exposição ao agente esterilizante.

A resistência específica a certo agente esterilizante é dada pelo tempo de redução decimal (Valor D), a uma temperatura constante de referência. O Valor D é definido como o intervalo de tempo necessário para redução de 90% da população microbiana, inicialmente presente no produto à temperatura constante.

Na escolha do indicador biológico deve-se conhecer a população inicial de esporos e, também, o Valor D requerido. No método *overkill*, o efeito do tempo de aquecimento é avaliado em termos do número de ciclos reduzidos

em uma população inicial de esporos. O nível de esterilidade (SAL – *Sterility Assurance Level*) depende das características do Indicador Biológico (número inicial de esporos e Valor D), temperatura e tempo total de exposição (PENNA *et al.*, 1998).

O indicador biológico é uma suspensão de microrganismos específicos, não patogênicos, resistentes a um determinado processo de desinfecção ou esterilização. Devem multiplicar-se rapidamente facilitando sua contagem por semeadura de profundidade e permitindo reprodutibilidade e precisão do ensaio. Além disso, devem apresentar resistência superior à resistência dos microrganismos originalmente presentes no produto a ser esterilizado (ISO 14937, ISO 11134).

Enzimas e proteínas também têm sido utilizadas como IBs para avaliação imediata da eficácia de processos industriais, tais como branqueamento, pasteurização, desinfecção e também para monitorar a conservação de um produto submetido previamente à desinfecção ou esterilização (EAGERMAN E ROUSE, 1976; FORSYTH *et al.*, 1999; PIYASENA *et al.*, 1998; TIJSKENS *et al.*, 1999; PENNA *et al.*, 2004; VILLAMIEL *et al.*, 1997).

A proteína verde fluorescente (GFP) pode ser empregada como indicador biológico devido à facilidade de sua detecção por espectrofluorimetria ou por inspeção visual utilizando lâmpada UV portátil (VESSONI PENNA *et al.*, 2002, PENNA *et al.*, 2004). A proteína GFP demonstrou em trabalhos anteriores resistência à exposição a agentes químicos e a temperaturas elevadas (PENNA *et al.*, 2004). A resistência da GFP possibilita sua utilização como indicador biológico, pois, após

determinado tratamento térmico, a ausência ou diminuição da intensidade de fluorescência emitida indica que microrganismos presentes também foram afetados.

Devido à importância da validação de procedimentos de sanitização de sistemas de água purificada para uso hospitalar e industrial, torna-se proeminente o estabelecimento de um indicador biológico que apresente resultados rápidos e seguros sobre a eficiência do processo.

A água é o principal veículo da formulação farmacêutica e o de maior relevância como fonte de contaminação. Em hospitais a água é parte essencial do processo de limpeza, desinfecção e esterilização de ambientes, superfícies e material (crítico, semi-crítico e não crítico), tanto para enxágue quanto para diluição de agentes químicos saneantes.

O presente trabalho encontra-se dividido em capítulos redigidos sob a forma de artigos, com exceção do Capítulo I, que consiste em revisão bibliográfica breve abrangendo os tópicos estudados. Desta forma, determinadas informações que constam em um capítulo são repetidas nos capítulos seguintes. Dentre os artigos que compõe o trabalho final os Capítulos II, III, IV, V e VII já foram publicados (vide anexos) e o Capítulo VI já foi submetido e aceito para publicação.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho consistiu em avaliar a resistência de microrganismos responsáveis por surtos de infecção hospitalar e contaminantes de sistema de purificação de água frente às soluções de agentes químicos empregadas com maior frequência, e estudar a proteína verde fluorescente (GFP) como potencial indicador biológico nestes ambientes.

Com esta finalidade, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Avaliar a eficácia de agentes sanitizantes de uso hospitalar, através da determinação da concentração inibitória mínima;
- Avaliar a resistência microbiana frente aos agentes químicos sanitizantes de uso hospitalar através da determinação do tempo de redução decimal;
- Isolar e identificar os microrganismos contaminantes de cada etapa do sistema de tratamento de água, avaliando a concentração inibitória mínima dos agentes sanitizantes empregados neste sistema, frente aos microrganismos isolados e às cepas padrão;
- Analisar a resistência de microrganismos isolados de um sistema de purificação de água (microrganismos denominados *in house*, para facilitar a compreensão) e comparar com a resistência de microrganismos padrão. Avaliar se o regime de desinfecção empregado atualmente no sistema de purificação de água é eficaz frente aos microrganismos estudados, enfatizando as implicações da validação microbiológica do processo.

- Avaliar a estabilidade da proteína verde fluorescente na presença de soluções coloridas diluídas em diferentes tampões e água para injeção, analisando o comportamento da proteína, através da emissão de fluorescência da GFP em contato com as diversas soluções coloridas, relacionando a perda de fluorescência e o valor final de cada solução estudada.
- Extrair a proteína GFP de lisado celular de *E. coli*, através de sistema micelar de duas fases aquosas, estabelecendo um método que pode ter sua escala ampliada, e melhor relação custo-benefício quando comparado a métodos utilizados atualmente.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A primeira referência de desinfetante que se tem notícia, foi feita por Homero em A Odisséia, onde citava o uso do enxofre na forma de dióxido de enxofre (aproximadamente 800a.C.). Substância ainda hoje empregada na preservação de frutas secas, sucos de frutas e vinho (MAZZOLA, 2000).

Louis Pasteur (1822-1895), com seu trabalho criterioso, contribuiu para o desenvolvimento da microbiologia como ciência ao demonstrar serem os microrganismos os responsáveis por doenças infecciosas. Pasteur desenvolveu o método físico, denominado pasteurização, ainda hoje utilizado na higienização de produtos alimentícios.

As soluções anti-sépticas têm sido empiricamente utilizadas durante séculos, mesmo antes de Pasteur e Koch demonstrarem a existência de microrganismos. O interesse de avaliações da eficácia terapêutica das soluções anti-sépticas tópicas diminuiu com o uso indiscriminado de antibióticos.

1.1 Ambiente Hospitalar

A legislação brasileira (ANVISA, 1988, 1999, 2001) prevê as soluções anti-sépticas adequadas para uso em áreas da saúde. Assim também, sugere as condições mínimas necessárias para o uso apropriado de um anti-séptico. Um produto químico na qualidade de anti-séptico deve apresentar: atividade germicida sobre a flora cutânea, sem causar irritações à pele ou mucosas,

não provocar reações alérgicas ou queimaduras, possuir baixo teor de toxicidade (ANVISA, 1988).

As infecções emergentes são caracterizadas por casos isolados ou surtos em estabelecimentos de saúde. Em hospitais e postos de saúde as infecções estão associadas à inadequada desinfecção de artigos médicos. A severidade destes casos varia de colonização assintomática à morte, com um grande número de agentes causadores distintos.

Os indicadores biológicos *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* são utilizados na padronização das técnicas de aplicação dos agentes esterilizantes e desinfetantes, respectivamente (MAZZOLA, 2000, McDONNELL E RUSSEL, 1999, RUTALA, 1998, VESSONI PENNA, 1997).

Através da determinação da concentração mínima inibitória (VESSONI PENNA *et al.*, 2001) e do tempo de redução decimal valor D (VESSONI PENNA, 1997) e da classificação do espectro de atividade de cada agente esterilizante, torna-se possível esboçar um programa de limpeza, desinfecção e esterilização no ambiente hospitalar, principalmente de materiais reutilizáveis (ALFA *et al.*, 1996, RUTALA e WEBER, 1996, VESSONI PENNA *et al.*, 1997).

Esforços para diminuir o risco de transmissões de infecções incluem programas no qual os desinfetantes desempenham papel crucial. Infecções podem ser transmitidas tanto à pacientes submetidos a tratamentos de endoscopia, cateterismo e outros. As superfícies de materiais médico hospitalares, se não estiverem diretamente ligados à transmissão de doenças, podem contribuir potencialmente para uma contaminação cruzada secundária.

Os procedimentos básicos de descontaminação são de fundamental importância para a prevenção na disseminação de doenças em geral, principalmente no ambiente hospitalar, transmitidas por água e por contacto pessoal. Para obter-se um processo de desinfecção eficiente é necessário que se submeta a superfície em questão, primeiramente à limpeza mecânica (fricção) associada à química (solução detergente, desincrostante ou enzimático) para remoção da sujidade, pois a matéria orgânica é capaz de diminuir a ação dos desinfetantes na maioria das vezes de sua aplicação (RUTALA, 1998)

Cada instrumento ou superfície do estabelecimento do ambiente de saúde que entra em contato com um paciente é um disseminador potencial de infecção (RUTALA e WEBER, 1998).

Há fatores que alteram a eficácia dos procedimentos de desinfecção e esterilização (NOGAROTO e PENNA, 2006). A atividade antimicrobiana dos agentes químicos depende de uma variedade de fatores relativos à natureza, estrutura e condições dos microrganismos e componentes químicos e físicos do ambiente externo. O conhecimento desses fatores é imprescindível para uma adequada aplicação dos processos de desinfecção e esterilização. A não observância desses fatores pode implicar insucesso desses procedimentos (NOGAROTO e PENNA, 2006).

Os principais interferentes são (NOGAROTO e PENNA, 2006):

(i) Microrganismos - os microrganismos variam consideravelmente quanto à susceptibilidade aos agentes desinfetantes químicos em função de sua constituição. As diferenças em relação à resistência das bactérias na forma vegetativa não são muito significativas, exceto as

micobactérias, que devido às características hidrofóbicas da superfície celular são comparativamente mais resistentes a uma variedade de agentes desinfetantes.

(ii) Número e localização dos microrganismos - a atividade antimicrobiana é diretamente relacionada ao número de microrganismos presentes. Quanto maior a carga microbiana, maior o tempo de exposição necessário para destruí-la. Assim, uma limpeza prévia escrupulosa, visando reduzir o número de microrganismos, é de grande interesse para o processo de desinfecção. A localização e a acessibilidade aos microrganismos deve ser considerada, uma vez que somente as superfícies em contato direto com os produtos serão desinfetadas. Equipamentos contendo múltiplas peças devem ser desmontados e imersos completamente no agente, impedindo a formação de bolhas.

(iii) Concentração e potência do agente químico/tempo de exposição - com poucas exceções quanto mais concentrado o produto, maior é a eficácia e menor o tempo de exposição necessário para a destruição dos microrganismo.

(iv) Fatores físicos e químicos - diversos fatores físicos e químicos influenciam nos processos de desinfecção e esterilização, sendo os mais importantes a temperatura, o pH, a umidade relativa e a dureza da água.

(v) Matéria Orgânica - a matéria orgânica (em diversas formas como soro, sangue, pus, material fecal e resíduos de alimentos) interfere na ação dos agentes antimicrobianos de pelo menos duas maneiras: mais

comumente ocorre uma relação entre os compostos e o material orgânico, resultando num complexo menos ativo e deixando uma menor quantidade do agente químico disponível para atacar os microrganismos. Esta redução é notadamente observada com compostos altamente ativos como os liberadores inorgânicos de cloro; alternativamente o material orgânico pode proteger os microrganismos da ação desinfetante, funcionando como uma barreira física. A redução da carga de matéria orgânica previamente à desinfecção é desejável com o objetivo de minimizar a interferência descrita.

Estudos têm demonstrado que a limpeza manual ou mecânica, com água e detergente e/ou associados a produtos enzimáticos, reduz aproximadamente 10^5 microrganismos da população inicialmente considerada (ALFA *et al.*, 1996, CONRAD, 2001, DIAZ *et al.*, 2000, MAZZOLA *et al.*, 2000, TRAUMANN *et al.*, 2001, VESSONI PENNA *et al.*, 1997).

Além disso, deve-se ressaltar que para o estabelecimento de parâmetros de destruição microbiana para um artigo deve-se levar em consideração o *bioburden* máximo esperado, na ordem de 10^3 ou 10^4 , se o *bioburden* for mais elevado, maior dificuldade haverá para o processo de esterilização, colocando em risco a segurança do processo. Assim, é lícito afirmar que a limpeza rigorosa é condição básica para qualquer processo de desinfecção ou esterilização. É possível limpar sem esterilizar, mas não é possível garantir a esterilização sem limpar.

Esterilidade

Esterilização é o processo que objetiva destruir todas as formas de vida com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de conservação e de utilização do produto. Conservar é manter as características do produto durante a vida útil de armazenamento (vida de prateleira) à temperatura ambiente.

Esterilidade ou nível de segurança é a incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização, durante a conservação e utilização de um produto. A manutenção do nível de esterilidade conferido a um produto garante o prolongamento da vida útil de prateleira e depende das operações pré-esterilização, de esterilização e pós-esterilização.

Os métodos de esterilização permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas em produtos farmacêuticos, médico-hospitalares e alimentícios. O método escolhido depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presente no item considerado. O calor, a filtração, a radiação e o óxido de etileno podem ser citados como agentes esterilizantes.

O calor não é somente o agente esterilizante mais usado como também o mais econômico e mais fácil de controlar. O calor úmido quando comparado ao calor seco é um processo efetivo em função do uso de temperaturas mais baixas e, do curto período de tempo necessário para garantir o nível de esterilidade proposto.

Sendo os esporos bacterianos altamente resistentes às condições ambientes adversas, eles são usados como indicadores biológicos na

avaliação do nível de esterilidade atingido, e de possíveis falhas operacionais.

Esporos de *Bacillus stearothermophilus* são considerados convenientes indicadores biológicos na esterilização pelo calor úmido, particularmente à temperatura de referência de 121°C. Os esporos de *Bacillus subtilis* são empregados nos processos de esterilização pelo calor seco e pelo óxido de etileno e os esporos de *Bacillus pumilus* indicados para validar processos cujo agente esterilizante é a radiação iônica (USP 28).

Os indicadores físicos e biológicos são recomendados para validar ciclos de esterilização e condições de processamento: (i) os indicadores físicos, termopares conectados a um registrador de temperatura, são distribuídos em diferentes pontos da câmara e da carga, e medem a distribuição do calor, indicando os pontos frios; e (ii) os indicadores biológicos, microrganismos resistentes ao agente esterilizante, são utilizados para verificar se as medidas físicas garantem o nível de esterilidade estabelecido (USP 28).

O procedimento tempo/temperatura selecionado depende do produto, do tipo, do teor e da fonte dos contaminantes antes da esterilização, da aplicação de métodos para minimizar tal contaminação e preveni-la pós - processamento, contribuindo para assegurar o êxito da esterilização (VESSONI PENNA, 1994, VESSONI PENNA *et al.*, 1994).

Destruição Microbiana

O produto se mantém conservado se não houver a manifestação dos microrganismos presentes; isto significa dizer que, após a exposição ao calor úmido, poderá haver microrganismos dormentes ou em estado latente de sobrevivência, que não se multiplicarão durante a vida útil de prateleira, porque o produto não oferece condições favoráveis de germinação e reprodução.

O número final de microrganismos sobreviventes expostos ao calor úmido representa o efeito do processo. A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica, equivalente à cinética química de uma reação de 1ª ordem. O fenômeno de destruição térmica pode ser representado pelo modelo de curva linearizada, semi - logarítmica de sobreviventes. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição à temperatura constante resulta em curva linearizada decrescente. A variação do número de sobreviventes, com o tempo de exposição, é função do número de microrganismos inicialmente presentes, e é representada pela equação:

$$\log N_f = \log N_0 - \left(\frac{k}{2,303}\right)t \quad (1)$$

Em que, $\log N_f$ é o logaritmo decimal da população sobrevivente após um tempo (t) de exposição, $\log N_0$ é o logaritmo decimal da população no tempo inicial ($t=0$), k é a constante de velocidade específica de destruição por unidade de tempo (t). Para um mesmo microrganismo todos os parâmetros de tratamento devem ser mantidos constantes durante o tempo de exposição

estabelecido; pois a resistência térmica é função da concentração de vapor úmido presente.

Para o modelo de curva semi-logarítmica de sobreviventes, o tempo necessário para a destruição de 90% da população de esporos é o intervalo de tempo exigido para a curva percorrer 1 (um) ciclo logarítmico. O intervalo de tempo de redução decimal (valor D) é o principal parâmetro de avaliação das características de termoresistência da população microbiana homogênea.

O valor D ou tempo de redução decimal é o intervalo de tempo, à temperatura constante de tratamento, para uma redução de 90% da população microbiana, inicialmente presente no produto. O valor D é o inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta calculada utilizando-se do método da regressão linear, através dos mínimos quadrados, aplicado à região linear da curva de sobrevivência. O valor D relaciona-se à constante específica de reação através da relação:

$$D = \left(\frac{2,303}{k} \right) \quad (2)$$

Portanto a equação (1) pode ser igualmente representada por:

$$\log N_f = \log N_0 - \left(\frac{1}{D} \right) t \quad (3)$$

O nível de destruição térmica (n) é o número de ciclos logarítmicos reduzidos na população microbiana. Se o nível de destruição térmica corresponder a um ciclo reduzido (n=1), então o tempo total de processo (t) é equivalente ao tempo de redução decimal valor D. Logo o tempo de processo à temperatura de referência (T_r) é um múltiplo do tempo de redução decimal.

O bioindicador adequado deve apresentar uma população de esporos e uma termorresistência ao processo de esterilização superiores às daquelas dos microrganismos originalmente presentes no produto a ser esterilizado.

Nível de Esterilidade ou “Sterility Assurance Level” (SAL)

O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população do bioindicador define o nível de esterilidade ou “*Sterility Assurance Level*” (SAL) do produto final. O nível de segurança do processo define a probabilidade de falha prevista para a operação, estabelece o número final de sobreviventes (N_f) por unidade de produto e define o tempo de processo à temperatura de referência.

Os níveis de destruição e de número final (N_f) de esporos sobreviventes por unidade de produto, assumindo população inicial unitária ($N_0 = 1$ UFC), sugerem uma população sobrevivente de *Clostridium botulinum* de $N_f = 10^{-12}$ UFC (1 unidade contaminada para cada 10^{12} unidades do produto) equivalente a 12 ciclos reduzidos; para bactérias mesófilas não patogênicas (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*) uma população final de $N_f = 10^{-5}$ UFC (1 unidade contaminada para cada 10^5 unidades do produto) equivalente a 5 ciclos reduzidos; para bactérias termófilas não patogênicas (*Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum*), $N_f = 10^{-3}$ UFC (1 unidade contaminada para cada 10^3 unidades do produto) equivalente a 3 ciclos reduzidos (NOGAROTO e PENNA, 2006).

O nível de esterilidade é o nível de certeza de ausência de multiplicação microbiana, durante a conservação e utilização de um produto; e depende da população inicial (N_o) do produto. O nível de segurança definido em $N_f = 10^{-6}$ (uma unidade de produto contaminada em cada 10^6 unidades expostas) é equivalente à redução de 12 ciclos logarítmicos na população microbiana original do produto, admitindo $N_o = 10^6$ UFC por unidade. As medidas preventivas podem aumentar o nível de segurança para um universo superior a $N_f > 10^{-6}$ UFC por unidade do produto.

1.2 Sistemas de Tratamento de Água

A água é um dos elementos de maior importância para todas as formas de vida na Terra. Ela está presente em todos os organismos vivos, fazendo parte de uma infinidade de substâncias e órgãos. Além disso, transporta diversos compostos nutritivos no solo, movimenta turbinas na produção de energia elétrica, refrigera máquinas e motores, ajuda a controlar a temperatura da atmosfera e apresenta ainda uma série de funções de extremo valor. Esse líquido é indispensável para a manutenção da vida na Terra, é essencial para a composição e renovação das células, 70% do corpo humano é constituído por água, participa da composição dos tecidos e transporta as mais diversas substâncias no organismo.

Para que seu uso não traga complicações à saúde, a água deverá ser potável, ou seja, isenta de contaminação e/ou poluição, pois vários organismos nas águas causam doenças ao ser humano, determinando processos infecciosos, toxigênicos ou parasitários. Os estados mórbidos

produzidos por estes microrganismos podem ser mais ou menos graves, dependendo das características de defesa do novo hospedeiro. Por esta razão, este tipo de contaminação assume papel importante em áreas hospitalares. A avaliação destes agentes infecciosos é baseada na sua virulência ou potencial de causar doenças em seres humanos. A virulência é uma característica epidemiológica ligada à dose de agente infeccioso necessária para infectar o novo hospedeiro e causar doença. Este potencial também depende da estabilidade do referido agente no ambiente, neste caso a água (MARTINS e PENNA, 2000).

Grandes surtos transmitidos pela água foram relatados pelo EPA (*Environmental Protection Agency*), e pelo CDC (*Center for Disease Control*). A primeira epidemia descrita foi em 1920. No período compreendido entre 1971 e 1985, foram registrados 502 surtos endêmicos de doenças veiculadas pela água, acometendo 111.228 pessoas no território norte-americano. No âmbito das infecções hospitalares em 1996, um grande surto se instalou na cidade de Caruaru (Pernambuco), com características ímpares, afetando 131 pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise. Destes, 46 pacientes foram a óbito por intoxicação a partir de toxina microcistina (produzida pela alga microcística), caracterizando-se como a maior intercorrência de intoxicação hospitalar do gênero, até os dias atuais (MARTINS e PENNA, 2000).

Admite-se que a maior demanda de água se destina ao consumo humano, com uma qualidade relativamente garantida até o ponto em que termina a rede de tubulações de transporte. Embora a água potável esteja apta ao consumo humano, não assegura que a qualidade denominada

potável também o seja para o uso em instalações industriais, na elaboração de medicamentos, de produtos alimentares, de cosméticos ou matérias-primas químicas farmacêuticas (MACEDO, 2001, MARTINS e PENNA, 2000).

Toda a instalação industrial farmacêutica relacionada à elaboração e processamento de medicamentos e outros produtos para a saúde são imprescindíveis alguns insumos, os quais podem ser caracterizados por diferentes graus de pureza. Este é o caso da água. A água, na indústria farmacêutica, é o principal insumo utilizado, sendo incorporada aos produtos durante o processamento, utilizada nas operações de transformação, em processos de esterilização, sob a forma de vapor, em operações de troca térmica (aquecimento ou resfriamento) e para a limpeza e higiene (MACEDO, 2001, MARTINS e PENNA, 2000).

Por isso, toda instalação industrial ou farmacêutica relacionada com produtos para a saúde necessita contar com um processamento adequado de purificação da água potável, que permita satisfazer suas necessidades peculiares, muito especialmente em função dos problemas relacionados com o armazenamento da água e de sua distribuição. Este procedimento deve assegurar o fornecimento segundo os volumes necessários, de acordo com a qualidade exigida nos pontos de consumo. Estudos recentes demonstram que quase todo grande sistema de purificação de água, pode formar biofilme em suas tubulações. Este biofilme pode espalhar microrganismos dentro do sistema e contribuir para o aumento de partículas, bactérias e aumento no nível do carbono orgânico total. Esta contaminação pode afetar todo o processo dentro de uma indústria farmacêutica ou ambiente hospitalar (MACEDO, 2001, MARTINS e PENNA, 2000).

Em ambientes de saúde a condição crítica do processo exige água com um grau de pureza maior do que aquele garantido á água potável. Este grau de pureza microbiologicamente é definido pela quantidade e também pelas diferentes espécies de microrganismos presentes. Deste modo, a identificação dos microrganismos presentes em sistemas de tratamento de água, é de grande importância. A avaliação a resistência destes microrganismos frente aos sanitizantes utilizados nos processos de limpeza e desinfecção dos sistemas de purificação da água (NOGAROTO e PENNA, 2006).

As principais etapas do sistema de purificação de água estudado são (NOGAROTO e PENNA, 2006):

- (i) Filtração - o método de filtração é utilizado na remoção de materiais insolúveis. A eficiência depende do tipo de filtro de profundidade selecionado, sua função é otimizar estágios seguintes. Para sistemas de grandes vazões utilizam-se materiais como: antracito granular, quartzo ou areia. Para sistemas menores usa-se filtro material sintético.
- (ii) Carvão ativado - o leito de carvão é utilizado para adsorver material orgânico de baixa massa molecular e agente oxidantes (compostos clorados). Removem o cloro e protegem as partes do sistema construído em aço inoxidável, as resinas iônicas e as membranas de osmose. Os processos alternativos são os aditivos químicos ou os removedores regeneráveis de materiais orgânicos.
- (iii) Abrandadores e deionizadores - abrandadores são resinas catiônicas do tipo ciclo de sódio e são regeneráveis por tratamento

com salmoura. É importante controlar o crescimento bacteriano tanto nas resinas como nos tanques de salmoura, seja por recirculação durante os períodos de baixa demanda, com a instalação de lâmpadas ultravioletas (UV), ou por aditivos químicos. Os deionizadores trocam cátions e ânions indesejáveis por H^+ e OH^- respectivamente. As resinas catiônicas são regeneradas com ácidos (clorídrico ou sulfúrico) e as aniônicas com hidróxidos (de sódio ou de potássio). A vantagem é que os agentes de regeneração ajudam a controlar a flora microbiana, a frequência de regeneração pode ser acelerada por envenenamento da resina por material orgânico.

- (iv) Osmose reversa - Sob uma força maior que a pressão osmótica, a membrana de osmose reversa permite a passagem de água purificada e descarta componente orgânico e inorgânico. Este processo é efetivo e em dupla passagem pode produzir água de altíssima pureza química e microbiológica. Para sua melhor eficácia e durabilidade deve-se considerar o tratamento prévio da água de alimentação ao sistema de osmose reversa, bem como a seleção do material e desenho para sua construção. A exemplo de outros processos unitários em que se contratam outras empresas para a regeneração de membranas ou colunas, o controle de contaminação pós-regeneração é muito importante para assegurar a consistência da qualidade.

1.3 A Proteína Verde Fluorescente

A bioluminescência é um fenômeno natural observado em diversas espécies de organismos marinhos e terrestres. No ambiente terrestre, insetos como os vaga-lumes são os representantes mais conhecidos (PENNA *et al.*, 2004a).

O mecanismo químico de produção de luz por organismos marinhos difere para cada espécie. A maioria apresenta somente quimioluminescência ou bioluminescência que resulta de uma reação química mediada por fotoproteínas (PENNA *et al.*, 2004a).

A GFP selvagem absorve UV e luz azul com um pico máximo de absorvância a 395 nm e um menor pico a 470 nm e emite luz verde com um pico máximo de emissão a 509 nm e um pequeno espalhamento em 540 nm. A GFP selvagem quando inserida em procariontes precipita no citoplasma tornando-se não fluorescente (WARD, *et al.* 1980).

A GFPuv recombinante emite uma máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta (360-400 nm). Esta GFPuv é muito utilizada em estudos de expressão gênica porque pode ser facilmente visualizada com luz UV. A GFPuv foi recombinada através de técnicas sofisticadas de mutações puntiforme no DNA da GFP *in vitro* (CRAMERI, *et al.* 1996). O resultado foi a substituição de três aminoácidos (Phe⁹⁹ por Ser, Met¹⁵³ por Thr e Val¹⁶³ por Ala) da GFP selvagem, resultando na GFPuv. A GFPuv expressa pela *E. coli* apresenta fluorescência 18 vezes mais intensa que a GFP selvagem. Geralmente mutações interferem nos picos de absorção e emissão das

variantes da GFP. Porém a GFPuv conserva esta propriedade mantendo o comprimento de onda de emissão em 509 nm (CRAMERI, *et al.* 1996).

A GFP selvagem é resistente a temperaturas de até 70°C, a pH alcalino (inferior a 12) detergentes, solventes orgânicos algumas proteases (ROBART & WARD, 1990). Alguma fluorescência é observada quando nanogramas da proteína nativa é aplicada em 1% SDS em gel de poliacrilamida (INOUE & TSUJI, 1994).

A GFP é fluorescente em ambas as conformações, tanto no monômero quanto no dímero. A proporção das formas monoméricas ou diméricas dependem da concentração da proteína no meio. A GFP selvagem dimeriza via interações hidrofóbicas em concentrações de proteína 5 a 10 mg/mL. A dimerização resulta em uma diminuição na absorção a 470 nm e num concomitante aumento da absorção em 395 nm. A GFPuv tem maiores possibilidade de dimerizar.

1.4 Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Os processos de separação e purificação de produtos obtidos por via biotecnológica não apresentaram o mesmo grau de desenvolvimento nos últimos anos, quando comparados à otimização dos processos fermentativos (ASENJO, 1990; KULA, 1985). Os processos hoje existentes para purificação de bioprodutos são constituídos, na sua maioria, de várias operações com baixos rendimentos tornando os custos de produção altos do ponto de vista industrial (RANGEL-YAGUI, 2003a).

Produtos derivados de processos biotecnológicos são geralmente obtidos de forma diluída e a partir de meios complexos contendo

contaminantes diversos, tais como: células, componentes celulares, proteínas contaminantes, componentes do meio de cultura, pigmentos, polissacarídeos, etc. Tais contaminantes podem diminuir a atividade biológica de uma molécula, ou até mesmo inviabilizá-la no momento da utilização (ASENJO, 1990; KULA, 1985).

A recuperação e purificação de biomoléculas diretamente de um meio fermentado é um fator crítico em biotecnologia, sendo responsável por grande parcela do elevado custo dos processos e produtos, justificando desta forma os esforços pelo desenvolvimento de novos processos de recuperação que visem melhor economia e rendimento (ASENJO, 1990).

A purificação industrial de enzimas ocorre, geralmente, através de processos múltiplos que consistem em técnicas de custo elevado tais como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (RANGEL-YAGUI, 2003a).

A extração líquido-líquido é um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. A extração líquido-líquido com solventes é empregada para a separação de antibióticos, como por exemplo, a eritromicina ou a penicilina, porém é uma técnica pouco viável para proteínas, pois a maioria pode sofrer desnaturação em solventes orgânicos (ASENJO, 1990; KULA, 1985).

Nos últimos anos vêm-se ampliando a utilização de métodos de extração líquido-líquido em sistema aquoso para se extrair proteínas biologicamente ativas. Para tanto se propõe a adição de polímeros hidrofílicos ou tensoativos não-iônicos a soluções aquosas no estabelecimento de duas fases imiscíveis. Uma outra alternativa é a utilização

de microemulsões de tensoativos em solventes orgânicos que caracteriza o sistema micelar reverso.

O método de separação de biomoléculas por Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), explora a característica que alguns sistemas micelares possuem de que, quando submetidos a determinadas condições, podem espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis (LIU *et al.*, 1998). Considerável interesse tem sido verificado na utilização desses sistemas para purificar e concentrar compostos como BSA, bacteriófagos, antibióticos, colesterol oxidase, lisozima e outras enzimas, vitaminas lipossolúveis e compostos orgânicos (RANGEL-YAGUI, 2003b; NIKAS *et al.*, 1992; SANCHES-FERRER *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1998; LEE E SU, 1999; QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.*, 1998).

Agentes tensoativos são moléculas tipicamente compostas por duas partes quimicamente distintas: porção hidrofílica e porção hidrofóbica. Em função dessa estrutura química diferenciada, quando essas moléculas de agentes tensoativos são dissolvidas em água ocorre a formação espontânea de estruturas agregadas conhecidas como *micelas*. Em uma micela, as caudas hidrofóbicas se atraem para minimizar o contato desfavorável com a água, enquanto que as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície externa da micela para maximizar esse contato (CHEVALIER, ZEMB, 1990). A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (ISRAELACHVILI, 1991).

Sob determinadas temperaturas e concentrações de agentes tensoativos, uma solução aquosa micelar homogênea pode se separar em

duas fases macroscópicas, ambas contendo micelas, porém com uma delas apresentando maior concentração dessas. Essa separação de fases é induzida pelo "aumento da temperatura" do sistema. É importante salientar que o teor de água em cada uma das fases obtidas é alto (em geral está acima de 90% p/p) portanto favorável para biomoléculas (LIU, 1996). O fenômeno de separação de fases induzido pelo "aumento da temperatura" pode ser representado por uma curva em forma de sino denominada de *curva binodal*, que é construída variando-se a concentração de tensoativo e a temperatura do meio (Figura 1.1). A curva binodal representa, com isto, o limite de separação, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, na qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas. Esse processo de separação de fases, segundo BLANKSCHTEIN *et al.* (1986), é resultado da competição entre os efeitos da "energia interna" que promove a separação das micelas da água e os efeitos entrópicos, que promovem a miscibilidade das micelas na água. Essas interações são, predominantemente, controladas pela temperatura.

Embora os agentes tensoativos, em particular os iônicos, possam se ligar a proteínas resultando em desnaturação, existem tensoativos não-carregados que não se ligam de forma intensa a essas biomoléculas e portanto não as desnaturam (MAKINO *et al.*, 1973). Portanto, os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas constituídos por agentes tensoativos não-carregados podem proporcionar um ambiente ameno e compatível com biomoléculas (LIU *et al.*, 1998; SIRIMANNE, *et al.* 1998). As micelas, por serem susceptíveis a modificações em sua estrutura, possibilitam o controle e otimização da partição de biomoléculas pelo ajuste de suas características

como tamanho e forma através da variação da temperatura, concentração do tensoativo e adição de sais. O caráter anfifílico das micelas pode oferecer ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos aos solutos, permitindo seletividade na separação baseado na hidrofobicidade das biomoléculas. Além disso, a seletividade da partição pode ser melhorada com a utilização de ligantes de afinidade específicos à biomolécula-alvo ou misturas de tensoativos iônicos e não-iônicos.

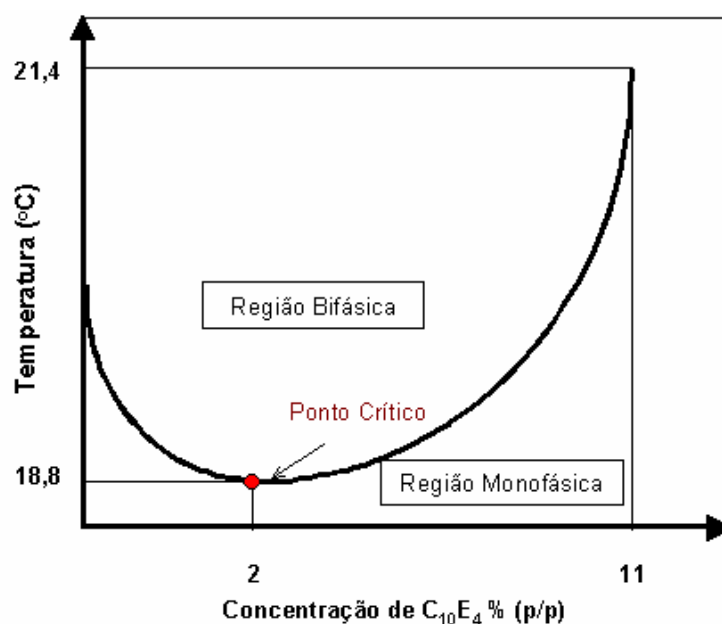


Figura 1.1. Curva Binodal Experimental de uma solução aquosa de $C_{10}E_4$ obtida por Liu *et al.*(1996).

NIKAS *et al.* (1992) apresentaram uma formulação teórica para descrever e estimar a partição de proteínas hidrossolúveis em SMDFA contendo micelas cilíndricas e não-carregadas. A teoria desses autores se baseou no fato de que as interações do tipo "volume de exclusão" entre as proteínas globulares hidrofílicas e as micelas cilíndricas não-carregadas desempenham uma função importante sobre a partição. Diversos

experimentos realizados por LIU *et al.* (1996) mostraram haver uma boa correlação entre essa teoria proposta e os dados experimentais obtidos com a partição de diversas biomoléculas como o citocromo C, inibidor de tripsina de soja, ovalbumina, albumina de soro bovino e catalase, utilizando como agente tensoativo não-iônico o óxido de n-decil-tetraetileno ($C_{10}E_4$). Essa boa correlação encontrada entre a proposta teórica e os dados experimentais reforçou a hipótese de que as interações do tipo "volume de exclusão" entre micelas cilíndricas não-carregadas e proteínas globulares hidrofílicas são o fator dominante na partição de biomoléculas por SMDFA.

CAPÍTULO II

ESCOLHA DO AGENTE ESTERILIZANTE/DESINFETANTE —

Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)

2.1 INTRODUÇÃO

O primeiro passo para escolha de um agente sanitizante/esterilizante é a determinação da sua finalidade e do tipo de área, material ou superfície a ser submetida ao tratamento (MAZZOLA, 2000). É necessário que alguns termos estejam claramente definidos (RUTALA e WEBER, 2004):

(i) limpeza - é o procedimento de remoção de sujidades e detritos para manter em estado de asseio os artigos, reduzindo a população microbiana. A limpeza deve preceder todos os procedimentos de desinfecção e esterilização, pois reduz a carga microbiana através da remoção da matéria orgânica presente. A limpeza com água e sabão reduz cerca de 99% da população inicial (*bioburden*). A presença de matéria orgânica altera parâmetros dos processos de desinfecção e esterilização, além de torná-los mais lentos.

(ii) descontaminação - tem como objetivo reduzir a carga de microrganismos presentes nos artigos, tornando-os seguros para o manuseio, diminuindo o risco ocupacional. Neste processo não há necessidade de emprego de substâncias químicas desinfetantes, pois a maioria dessas soluções tem grande afinidade por moléculas orgânicas, arrastando o microrganismo contaminante com a matéria orgânica.

(iii) desinfecção - remoção de microrganismos na forma vegetativa, independente de serem patogênicos, presentes em artigos e superfícies inanimados, ocorrendo eventual remoção de bactérias esporuladas. A desinfecção pode ser classificada em desinfecção de alto nível (deve incluir a eliminação de bactérias vegetativas, bacilo da tuberculose, fungos, vírus e esporos bacterianos, sendo indicada para itens semi-críticos); desinfecção de nível médio ou intermediário (eliminação da maioria dos fungos, de todas as células vegetativas bacterianas e bacilo da tuberculose, sem ação sobre os esporos bacterianos, sendo indicada para artigos não-críticos e superfícies), desinfecção de baixo nível (não há ação sobre os esporos ou bacilo da tuberculose, atividade relativa sobre fungos, capaz de eliminar bactérias em forma vegetativa, sendo indicada para artigos que entrarão em contato somente com a pele íntegra ou para desinfecção de superfícies).

(iv) esterilização - processo que promove completa eliminação ou destruição de todas as formas de microrganismos que venham a se desenvolver durante a vida útil de prateleira do item considerado. Convencionalmente, considera-se um artigo estéril quando a probabilidade de sobrevivência de um microrganismo seja menor que 1:1.000.000 (10^{-6}). O processo de esterilização pode ser físico (vapor saturado/ autoclaves, calor seco, raios gama/cobalto), químico (glutaraldeído, formaldeído, ácido peracético), e físico-químico (esterilizadoras a óxido de etileno - ETO, plasma de peróxido de hidrogênio, plasma de gases, vapor de formaldeído).

Para que se possa diferenciar processos de limpeza e sanitização, as áreas são classificadas e subdivididas, segundo o risco potencial de aquisição de infecções em: críticas, semi-críticas e não críticas. Devido as suas peculiaridades, o centro cirúrgico possui técnicas de limpeza diferenciadas (ANVISA, 1988).

(i) áreas críticas - devido aos procedimentos realizados ou à manipulação de materiais infectantes, oferecem risco potencial para o paciente adquirir infecção.

(ii) áreas semi-críticas - todas aquelas que não exigem cuidados intensivos ou de isolamento. Por exemplo: ambulatório, radiologia, ultra-sonografia, enfermaria.

(iii) áreas não-críticas - são todas as áreas hospitalares não ocupadas por pacientes.

Os materiais que são utilizados nos estabelecimentos de saúde também podem ser classificados, segundo o risco potencial de transmitir infecção a pacientes em três categorias (ANVISA, 1988):

(i) artigos críticos - destinados aos procedimentos invasivos na pele, mucosas adjacentes, tecidos subepiteliais e no sistema vascular, bem como todos que estejam diretamente conectados com este sistema. Requerem esterilização para satisfazer aos objetivos que se propõe. Agulhas, cateteres intravenosos, materiais de implante são alguns exemplos.

(ii) artigos semi-críticos - artigos que entram em contato com a pele não íntegra ou mucosas íntegras requerem desinfecção de nível alto

ou intermediário, e em alguns casos mais específicos, requerem esterilização. Cânula endotraqueal, espéculo vaginal, equipamento respiratório são alguns dos exemplos.

(iii) artigos não-críticos - destinados ao contato com a pele íntegra ou aqueles que não entram em contato com o paciente, requerem limpeza ou desinfecção de baixo nível. Termômetros, estetoscópio, roupas de cama, são alguns dos exemplos que compõem este grupo.

Há fatores que alteram a eficácia dos procedimentos de desinfecção e esterilização. A atividade antimicrobiana dos agentes químicos depende de uma variedade de fatores relativos à natureza, estrutura e condições dos microrganismos e componentes químicos e físicos do ambiente externo. O conhecimento desses fatores é imprescindível para uma adequada aplicação dos processos de desinfecção e esterilização. A não observância desses fatores pode implicar insucesso desses procedimentos (MAZZOLA, 2000).

Apesar da grande oferta de produtos químicos no mercado, a escolha do mais adequado não é uma tarefa fácil. Várias características devem ser consideradas: espectro de ação, velocidade de inativação dos microrganismos, não ser corrosivo para metais, não danificar artigos ou acessórios de borracha, plásticos ou equipamentos óticos, não ser inativado pela presença de matéria orgânica, tolerar pequenas variações de pH, ter ação residual quando aplicado em ambientes, manter ação, mesmo quando submetido a pequenas diluições, ser inodoro, atóxico e estável (concentrado ou diluído) (ANVISA, 1988).

Eficiência de Desinfetantes

Devido ao número crescente de casos de infecções hospitalares, torna-se de extrema importância estabelecer programas de sanitização que implicam a escolha de agentes desinfetantes adequados, bem como de sua aplicação de maneira eficaz (PENNA *et al.*, 2001).

A fim de reduzir custos e falhas humanas no preparo e utilização das soluções sanitizantes, é necessário padronizar um mínimo de produtos químicos de eficácia comprovada, definir sua concentração e diluição indicada e a finalidade a que se destinam.

Pretendeu-se avaliar a eficácia de agentes sanitizantes de uso hospitalar, através da determinação da concentração inibitória mínima. As cepas microbianas testadas foram: *Bacillus subtilis* var. *globigii* ATCC 9372, *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter cloacae* IAL 1976 (registro do Instituto Adolfo Lutz), *Serratia marcescens* IAL 1478 (registro do Instituto Adolfo Lutz) e *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606, IAL 124 (registro do Instituto Adolfo Lutz).

Através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM ou CIM), e da classificação do espectro de atividade de cada agente esterilizante, torna-se possível esboçar um programa de limpeza, desinfecção e esterilização no ambiente hospitalar, principalmente de materiais reutilizáveis.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

Os microrganismos testados foram adquiridos da ATCC (*American Type Culture Collection*) ou do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Meios de cultivo, ácido peracético, iodo, peróxido de hidrogênio e demais reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Agentes químicos testados gluconato de clorexidina, composto quaternário de amônio, glutaraldeído, formaldeído, álcool etílico, solução de etanol com glicerina, Polvidine tópico[®] (PVPI), Polvidine sabão[®] (PVPI), Polvidine em solução aquosa[®] (PVPI) foram gentilmente cedidos por Aster Produtos Médicos Ltda (Sorocaba, SP), dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) foi gentilmente cedido por Johnson & Johnson's, compostos liberadores de cloro ativo (CRA's) foram preparados a partir de solução comercial de hipoclorito de sódio concentrada. A concentração de cloro, peróxido de hidrogênio e iodo livres foram determinadas pelo método iodométrico (BACCAN *et al.*, 1985).

2.2.2 Preparação do inóculo

As culturas foram mantidas em suspensão em meio caseína soja (TSA, Difco, Detroit, Michigan, USA) a 4° C com transferências semanais. Após 24h, as culturas desenvolvidas em TSA, a 22° C para *S. marcencens*, e a 35-37° C para *E. cloacae*, *A. calcoaceticus*, *E. coli*, *S. aureus*, foram transferidas para TSB (Difco), centrifugadas (1000g/ 15 min/ 4°C) e

ressuspensas em solução salina. A viabilidade das bactérias foi estimada através de cultura em profundidade em TSA, confirmando populações em concentrações maiores que 10^7 UFC/mL.

Culturas de esporos, desenvolvidas por 6 dias em meio de esporulação a 37°C para *B. subtilis*, e a 62°C para *B. stearothermophilus*, foram transferidas, centrifugadas (1935g for 30 min, quatro vezes), a suspensão foi mantida a baixa temperatura e em solução+ de acetato de cálcio (pH=9,7) à 4°C (PENNA *et al.*, 1998). A viabilidade do choque térmico ($80^\circ\text{C}/10$ min para *B. subtilis* e $100^\circ\text{C}/20$ min para *B. stearothermophilus*) esporos foram obtidos através de cultura em profundidade em TSA, confirmando populações em concentração maior que 10^6 esporos/mL.

2.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este ensaio consiste em avaliar o espectro de ação do agente químico, de acordo com a resistência dos microrganismos estudados. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para cada agente químico é realizada utilizando-se o método clássico de diluição sucessiva. Em doze tubos com rosca (10 x 100 mm) numerados distribui-se 1mL de meio de cultura TSB (*trypt soy broth*) para cada tubo exceto para o tubo número 1. Autoclava-se os tubos sob pressão constante e temperatura de 121°C . Para o primeiro e o segundo da série adicionar 1 mL da solução do agente químico sanitizante em teste, agitar o tubo 2 e transferir 1 mL para o tubo 3. Repetir a transferência sucessiva até o tubo 11.

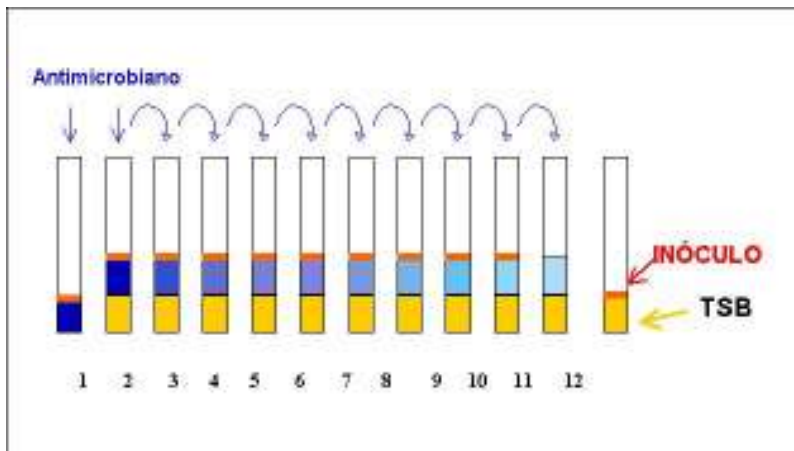


Figura 2.1. Esquema ilustrativo do método das diluições sucessivas.

Adiciona-se em todos os frascos, exceto para o de número 11, o inóculo (microrganismo em teste) em um volume de 0,1 mL e concentração conhecida. Incubar a temperatura ótima de crescimento por 24h e 48h (Figura 2.1.). Proceder à leitura, o CIM é o tubo de maior diluição onde se verifica a ausência de crescimento bacteriano. Os tubos 11 e 12 são os controles positivo (TSB + inóculo) e negativo (TSB + antimicrobiano) (PENNA *et al.*, 2001, MAZZOLA *et al.*, 2003).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os agentes químicos investigados (Tabela 2.1.) são extensivamente utilizados em soluções comerciais em centros de saúde e ambiente hospitalar tanto para uso tópico e em superfícies.

Na Tabela 2.1. são apresentados os resultados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) de agentes químicos ensaiados frente a suspensões das bactérias estudadas.

Os compostos quaternários de amônio (QACs) não apresentam atividade esporocida, sua atividade inibe o crescimento de microrganismos e a germinação de esporos (McDONNELL e RUSSELL, 1998). Valores de concentração inibitória mínima de 117 e 156 mg/L foram determinados para *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, e são duas vezes superiores aos valores de CIM para células vegetativas de *E. cloacae*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. marcescens* (CIM entre 59-78 mg/L), tendo sido *A. calcoaceticus* (9.77 mg/L) a bactéria mais sensível. Em centros de saúde os QACs são considerados desinfetantes de baixo nível, e no geral são empregados em concentrações de 2000 mg/L, sem formaldeído na formulação (ANVISA, 1988). Os QACs são amplamente utilizados como anti-sépticos, devido a sua ação não agressiva; e ainda aplicados em superfícies, pois apresentam atividade residual, podendo substituir compostos fenólicos mais tóxicos. Em berçários os QACs devem ser utilizados na limpeza de camas, balcões e outras superfícies, minimizando contaminação cruzada e os riscos de superpopulação de microrganismos.

Soluções de digluconato de clorexidina, em hospitais brasileiros, é empregada a 4%, utilizadas para lavagem das mãos pelos funcionários. Neste estudo, clorexidina foi eficaz frente a *B. subtilis* (CIM 1%), mas não apresentou eficácia quando testada frente a *B. stearothermophilus*. O intervalo de concentração de 63-71 mg/L demonstrou ser eficaz quando testado frente a *E. cloacae*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. marcescens* apresentou maior resistência e CIM ente 125-156 mg/L. Soluções contendo clorexidina (4%) em solução alcoólica são comumente empregadas na lavagem das mãos do corpo clínico e de funcionários, bem como na assepsia pré-operatória. O álcool adicionado na formulação previne contaminação cruzada com *B. proteus* e *Pseudomonas* (ANVISA, 1988, 1999). Solução alcoólica de clorexidina 0,5% é indicada como anti-séptico tópico, substituindo PVPI. Em concentrações menores (50 mg/L), clorexidina é empregada para limpeza de lentes de contato sendo capaz de reduzir populações de *S. marcescens*. Clorexidina (30 mg/L) em contato com *S. marcescens* por 10 minutos apresenta eficácia semelhante à soluções de 500 mg/L (DENTON, 1991), no entanto a habilidade dessa cepa de microrganismos voltar a se desenvolver após 24h de contato com soluções de até 60 mg/L também já foi demonstrada (GANDHI *et al.*, 1993).

Glutaraldeído tem efeito bactericida, esporocida, fungicida e viruscida, é amplamente empregado para desinfecções de alto nível de artigos críticos e semi-críticos. Em solução a 2% o tempo de exposição recomendado é de 6-8h (ANVISA, 1988, 1999). Os resultados de CIM determinados foram 2750-3750 mg/L para *B. subtilis*, *A. calcoaceticus*, *E. cloacae* e *E. coli* e 1375-1875 mg/L para *S. marcescens*, *S. aureus* e *B. stearothermophilus*. Apesar do

efeito antimicrobiano e da relação custo-benefício, os efeitos colaterais do glutaraldeído demandam uma série de cuidados e treinamentos antes do uso (RUTALA e WEBER, 1998), também é necessário que o produto seja neutralizado antes de ser descartado. Após enxágüe e remoção de possíveis resíduos o glutaraldeído não oferece riscos (KENNETH, 1994).

O formaldeído apresenta atividade esporocida, viruscida e fungicida, podendo ser empregado, também, na fumigação de ambientes. Foi observado que soluções de formaldeído 0,5 – 1% após 8h de contato promoveu a redução de 6 - 9 log₁₀, na média CIM de 58,5 mg/L para *S. marcescens*, 117 mg/L para *E. cloacae*, 156 mg/L para *S. aureus* e *E. coli*, 235 mg/L para *B. subtilis* e 246 mg/L para *B. stearothermophilus*. O uso de formaldeído no Brasil é permitido para desinfecção de alto nível de artigos críticos e não-críticos, tais como dialisador, filtros, cateteres, laparoscópios entre outros (ANVISA, 1988, 1999). A recomendação é que tais artigos devam ser imersos em solução de 8% de formaldeído em solução alcoólica por 18h (tal solução corresponde a solução de 2% em água), seguido por enxágüe abundante (ANVISA, 1988, 1999). Em sistemas de purificação de água, a membrana de osmose reversa pode ser imersa por 18h em solução de formaldeído 1%, seguido de enxágüe abundante. Formaldeído pode ainda ser administrado como anti-séptico urinário (100 – 200 mg/L na bexiga) (RUTALA e WEBER, 1998, KESSLER *et al.*, 1988). A maior desvantagem do formaldeído é a perda de atividade na presença de matéria orgânica e seu potencial carcinogênico (McDONNELL E RUSSELL, 1998, RUTALA e WEBER, 1998).

O álcool, na forma de soluções, não apresenta atividade esporocida, podendo inibir a germinação de esporos. Para reduzir populações de $6 \log_{10}$ de *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. cloacae* e *E. coli* foi necessária CIM de 8,75%. Alguns microrganismos testados apresentaram maior sensibilidade, CIM de 4,38% para *S. marcescens* e *A. calcoaceticus*. Soluções alcoólicas 70% são amplamente utilizadas na assepsia de mãos, pele, artigos e ambientes semi-críticos, mas não são empregadas em limpezas de rotina pois danificam superfícies de plástico, borracha e acrílico. A presença de glicerina (2%), evitando ressecamento da pele por ação do álcool, diminuiu a atividade do álcool. A adição de iodo (1% e 10%) reduziu a CIM para 4,38% quando em contato com *E. coli* e *S. aureus*, sendo que a presença de 10% de iodo reduziu a CIM do álcool para 2,19% para *B. subtilis*, *E. cloacae* e *S. aureus*. Nos hospitais brasileiros soluções de álcool 70% tem substituído soluções de formaldeído e fenol para limpeza-desinfecção de artigos não-críticos e semi-críticos (DIAZ *et al.*, 2000). Soluções alcoólicas também tem sido adicionadas a outros sanitizantes tais como clorexidina, formaldeído e PVPI (polivinilpirrolidona-iodo), para prevenir a contaminação com bactérias Gram-negativas que estão presentes em ambiente hospitalar e que podem ser responsáveis pela formação de biofilmes, impedindo a penetração de agentes desinfetantes.

Álcool também pode ser empregado como anti-séptico pré-cirúrgico em soluções com PVPI ou clorexidina, apresentando ação residual (ANVISA). TRAUMANN e colaboradores (2001) observaram que a desinfecção das mãos com álcool, antes e após do contato, com pacientes reduziu o isolamento de microrganismos Gram-negativos. Após a lavagem das mãos, a

assepsia com solução alcoólica representa a melhor alternativa para evitar surtos de infecções em centros de saúde, e também em ambientes de manuseio de alimentos. CONRAD (2001) verificou que o aumento do consumo de solução alcoólica em hospital suíço praticamente dobrou após controle rigoroso da limpeza e assepsia das mãos, diminuindo o número de infecções registradas.

O PVPI para soluções aquosas a concentração inibitória mínima determinada foi de 0,63 – 1,25%, para soluções alcoólicas a CIM foi de 0,16% para *E. coli* a 1,25% para *A. calcoaceticus* e *B. stearothermophilus*. A maior CIM encontrada foi para *B. subtilis* em ambas as soluções (2,5 – 5,0%). A incorporação de 10% de iodo na solução de PVPI aumenta a eficácia antibacteriana e diminui as irritações cutâneas. Tal solução é recomendada para assepsia tópica quando adicionada de detergente não-iônico (lauril éter sulfato). A solução alcoólica é utilizada para demarcação de campo cirúrgico (ANVISA).

Os compostos liberadores de cloro ativo (CRA), hipoclorito de sódio (NaOCl, pH \geq 9) e dicloroisocianurato de sódio (NaDCC, pH 7) são amplamente utilizados para anti-sepsia e desinfecção. Também são utilizadas para descontaminação de superfícies não-críticas contaminadas com sangue (RUTALA e WEBER, 1998) apesar da diminuição da eficácia na presença de matéria orgânica. Intervalos semelhantes de CIM foram observados para os microrganismos testados, considerando-se a concentração inicial de cloro livre variando entre 8000-9000 mg/L. As cepas vegetativas mais resistentes foram *E. coli* e *A. calcoaceticus*, com CIM em torno de 1250 mg/L, enquanto para as cepas esporo formadoras a CIM foi 4 vezes maior, entre 4000-5000

mg/L. O ajuste do valor de pH da solução de NaOCl para 7 reduziu as concentrações inibitórias mínimas em dez vezes, devido a predominância de HOCl, os valores de CIM foram 150-300 mg/L para células vegetativas e 620 mg/L para células formadoras de esporos. Hipoclorito de sódio é empregado como base de desinfetantes, apresentando um amplo espectro de atividade antimicrobiana em temperaturas variadas. Este composto é de fácil acesso, manuseio, não é tóxico e é compatível com detergentes. A forma não-dissociada, ácido hipocloroso (HClO) em água (pH 4-7) é responsável pela atividade antimicrobiana dos CRAs, e é 100 vezes mais efetiva que a forma dissociada OCl^- (pH>9) (VESSONI PENNA *et al*, 1996, McDONNELL E RUSSELL, 1998). Soluções comerciais de cloro devem ser tamponadas, favorecendo a manutenção do pH 7, e acelerando a formação de HOCl.

As soluções de peróxido de hidrogênio a 4% (40000 mg/L) causaram reduções de populações maiores que $8 \log_{10}$ e apresentaram CIM de 0,13% para *B. subtilis*, 0,25% para *B. stearothermophilus*. As demais cepas testadas apresentaram resistência inferior.

As soluções de ácido peracético 3% resultaram em concentração inibitória mínima entre 0,9-1,85% para reduzir populações maiores que $9 \log_{10}$ de *B. subtilis* e células gram-negativas. *B. stearothermophilus* e *S. aureus* apresentaram CIM de 0,45% de ácido peracético.

Peróxido de hidrogênio é um agente oxidante forte, de fácil manuseio e não tóxico, sendo amplamente utilizado em itens e superfícies não-críticas. Também é empregado no tratamento de efluentes, em indústria de alimentos e outras aplicações. SAGRIPANTI E BONIFACINO (1997) verificaram o efeito esporocida de soluções de peróxido de hidrogênio em concentrações de

10%, pois a presença de matéria orgânica não diminui sua atividade; concentrações inferiores também demonstraram efeito esporocida após maior tempo de exposição. O ácido peracético também apresenta atividade biocida em pH 2, no entanto é degradado pela presença de matéria orgânica, podendo esta solução ser empregada como desinfetante de artigos semi-críticos e superfícies. RUTALA e WEBER (1998) classificam o ácido peracético em solução com peróxido de hidrogênio (6%) e o glutaraldeído como agentes químicos esterilizantes, se forem empregados após limpeza e seguindo as normas de utilização.

Tabela 2.1. Concentração inibitória mínima (CIM) de agentes químicos ensaiados frente a suspensões de bactérias estudadas.

Bactéria	<i>B. stearothermophilus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>A. calcoaceticus</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. marcescens</i>		<i>S. aureus</i>	
	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
Quartenários	156	0,0156	117	0,0117	9,77	0,0010	78	0,0078	59	0,0059	59	0,0059	59	0,0059
Clorexidina	*	*	10000	1,0	63	0,0063	71	0,0071	71	0,0071	141	0,0141	71	0,0071
Glutaraldeído	1875	0,1875	3250	0,325	3250	0,325	3250	0,325	3250	0,325	1375	0,1375	1875	0,1875
Formaldeído	246	0,0246	235	0,0235	39	0,0039	117	0,0117	156	0,0156	58,5	0,0059	156	0,0156
Álcool	87500	8,75	87500	8,75	43750	4,375	87500	8,75	65650	6,565	43750	4,375	87500	8,75
Etanol + Glicerina	*	*	*	*	87500	8,75	87500	8,75	87500	8,75	87500	8,75	87500	8,75
Etanol + Iodo 1%	87500	8,75	87500	8,75	43750	4,375	87500	8,75	43750	4,375	43750	4,375	43750	4,375
Etanol + Iodo 10%	-	-	43750	4,375	-	-	43750	4,375	-	-	-	-	21870	2,187
Polvidine [®] tópico	12500	1,25	50000	5,0	12500	1,25	6250	0,625	12500	1,25	6250	0,625	6250	0,625
Polvidine [®] - sabão	6250	0,625	50000	5,0	6250	0,625	6250	0,625	6250	0,625	6250	0,625	6250	0,625
Polvidine [®] alcoólico	12500	1,25	25000	2,5	12500	1,25	3125	0,3125	1560	0,156	3125	0,3125	3125	0,3125
CRA 1% pH > 9	4491	0,4491	4491	0,4491	867	0,0867	420	0,0420	1129	0,1129	474	0,0474	945	0,0945
CRA 0,1% pH 7	621	0,0621	621	0,0621	150	0,015	150	0,015	150	0,015	150	0,015	150	0,015
Presept [®]	5990	0,599	5990	0,599	1123	0,1123	374	0,0374	1123	0,1123	187	0,0187	749	0,0749
H ₂ O ₂	1875	0,1875	1875	0,1875	469	0,0469	1250	0,125	2505	0,250	625	0,0625	938	0,0938

Legenda: QAC- composto quartenário de amônio, H₂O₂ - peróxido de hidrogênio; Álcool - etanol (EtOH) 70%; EtOH + I₂ - iodo em solução alcoólica; PVPI - polivinilpirrolidona iodo; CRA - composto liberador de cloro ativo; NaDCC - dicloroisocianurato de sódio; * - sem eficácia.

2.4 CONCLUSÕES

O método da concentração inibitória mínima permite comparações entre os microrganismos expostos aos mesmos agentes químicos, mas não permite que as atividades dos agentes químicos sejam comparadas de modo análogo. A presença de matéria orgânica nos ensaios, representada pelo meio de cultivo (TSB), é recomendada para aumentar a dificuldade de o agente químico atuar nos microrganismos (SATAR, 1998). A limitação dos ensaios de determinação da CIM está em determinar o efeito do meio de cultivo em cada um dos desinfetantes.

CIM determina uma faixa de atividade desinfetante sobre um determinado grupo de microrganismos eleitos, e sugere qual microrganismo poderia ser empregado como IB em cada caso específico. Este método também é utilizado para selecionar um agente químico comercial que apresente melhor desempenho em comparação aos demais. Para que a performance de cada desinfetante seja avaliada é importante que se estude o tempo de redução decimal (valor D).

A diluição do agente químico até que se atinja a concentração bactericida deve ser realizada com água purificada, evitando-se contato com sujidades que ofereçam perda gradual de atividade do agente químico ou ainda permitindo que este se torne um veículo de microrganismos no ambiente hospitalar. As soluções de agentes químicos devem ser mantidas fechadas, protegidas de fontes de contaminação.

Desinfetantes líquidos são empregados no mundo todo devido ao seu custo-benefício. Em ambiente hospitalar o agente escolhido deve ser de fácil manuseio, sem efeitos tóxicos, e efetivos também em áreas tais como berçários e outras áreas críticas, evitando contaminação cruzada. O mal uso de soluções desinfetantes pode

desenvolver resistência dos microrganismos patogênicos. Faz-se necessário reforçar que mesmo os melhores programas de limpeza, desinfecção e esterilização podem promover infecções, caso não sejam realizados com eficiência, evidenciando a importância de treinamentos e a implantação de medidas de controle e avaliação periódicas.

CAPÍTULO III

ESCOLHA DO AGENTE ESTERILIZANTE/DESINFETANTE –

Determinação do Tempo de Redução Decimal (Valor D)

3.1 INTRODUÇÃO

Considerar um artigo ou um ambiente seguro em hospitais ou centros de saúde exige que um programa de limpeza e descontaminação seja empregado. Tal procedimento deve garantir a remoção de contaminates (orgânicos e inorgânicos) facilitando o acesso do agente sanitizante ao microrganismo (RUTALA, 1998).

Um programa de descontaminação tem início com um método de limpeza que assegure uma diminuição da população inicial de microrganismos viáveis (*bioburden*) presentes no material ou equipamento para garantir sucesso do processo de desinfecção ou esterilização subsequente (JACOBS *et al.*, 1998).

Agentes antimicrobianos aplicados a um material, sob determinadas condições, podem ser classificados de acordo com o nível de desinfecção garantido (MANDIGAN *et al.*, 2002; ANVISA, 1988, 1999, 2001), em: (i) anti-sépticos – agentes químicos que inibem crescimento microbiano, sendo não-tóxicos para tecidos vivos, são utilizados para descontaminação de mãos ou para curativos em feridas superficiais.

Em determinadas condições podem ser considerados desinfetantes; (ii) desinfetantes – agentes físicos ou químicos que destroem ou inativam de maneira irreversível a maioria dos microrganismos patogênicos, não necessariamente esporos e todos os vírus; (iii) sanitizantes – agentes químicos empregados para reduzir a níveis considerados aceitáveis pelos códigos de saúde pública vigentes, a

diferença principal entre sanitizantes e desinfetantes é que o desinfetante tem maior capacidade de reduzir a população de microrganismos patogênicos; (iv) esterilizantes – são desinfetantes de alto nível que em determinadas circunstâncias específicas garantem esterilização pois removem todas as formas viáveis de microrganismos dos objetos e superfícies, e incluem remoção ou inativação permanente de vírus e esporos bacterianos. Esterilização é associada a total ausência de microrganismos viáveis, referindo-se a uma condição absoluta e assegura a maior margem de segurança quando comparada a qualquer outro método antimicrobiano (ISO 14937, ISO 11134).

A classificação do nível de desinfecção ou de esterilização de um agente químico depende da resistência do microrganismo ao processo de desinfecção ou de esterilização, a avaliação da resistência microbiana frente a um agente sanitizante é realizada em duas etapas, a primeira, qualitativa, determina a concentração mínima do agente sanitizante necessária para reduzir a concentração inicial de microrganismos até valores pré-estabelecidos, a segunda etapa, quantitativa, avalia o tempo de contato necessário entre o microrganismo testado frente ao agente sanitizante. Este parâmetro de resistência microbiana é avaliada pelo tempo de redução decimal (valor D).

Dependendo da eficácia do agente químico testado o processo de desinfecção pode ser classificado (SPAULDING, 1968) em alto nível (podendo apresentar atividade esterilizante), nível intermediário (inativação de *Mycobacterium tuberculosis* e dos tipos mais resistentes de vírus), nível baixo (diminuição da população inicial de contaminantes). Desinfecção de níveis baixo e intermediário não são eficazes frente a microrganismos esporulados (PENNA *et al.*, 2001).

Com o objetivo de satisfazer os padrões pré-estabelecidos, é fundamental que se escolha um agente químico que seja eficiente de acordo com o artigo ou área que será descontaminada, bem como estabelecer qual o microrganismo que prevalece no determinado artigo ou área (CROSHAW, 1981).

A eficácia de um desinfetante ou processo de desinfecção pode ser alterada por: (i) limpeza prévia do material, (ii) concentração do desinfetante e duração da aplicação, (iii) concentração do desinfetante em solução e valor de final de pH, (iv) temperatura durante o processo de desinfecção.

A legislação brasileira (ANVISA, 1988, 1999) lista os agentes químicos e as recomendações para sua aplicação adequada, limites seguros em relação à toxicidade tolerada, e os proibidos. A legislação também estabelece a criação de uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e de Programas de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH), e define procedimentos para minimizar as infecções nosocomiais causadas pela elevada carga microbiana (*bioburden*) típica deste tipo de ambiente. No Brasil um número inferior a 20% dos hospitais têm um programa de controle de infecção hospitalar adequado (AGÊNCIA ESTADO ON LINE, acessado em Janeiro de 2003).

No presente trabalho os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus* foram selecionados de acordo com a incidência dos surtos de infecção hospitalar que foram veiculados pela mídia nos anos de 1996-2001 (AGÊNCIA ESTADO ON LINE, acessado em Janeiro de 2003, PENNA *et al.*, 2001) e foram avaliados quanto à resistência frente aos agentes químicos sanitizantes empregados com maior frequência em ambiente hospitalar. Além destes microrganismos foram testados também *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* por serem esporo formadores

e serem indicadores biológicos conhecidos para diferentes processos de desinfecção e esterilização.

O ensaio de resistência realizado foi a determinação do valor D (tempo de redução decimal), os níveis de confiança eleitos foram redução de 6 e $12\log_{10}$ do *bioburden*, garantindo que a probabilidade de sobrevivência dos microrganismos fosse 10^{-1} ou inferior.

O valor D ou tempo de redução decimal é o intervalo de tempo à temperatura constante de tratamento para que ocorra redução de 90% (1 ciclo logarítmico) da população microbiana, inicialmente presente no produto. Matematicamente, o valor D é calculado através do inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta calculada utilizando-se do método da regressão linear, através dos mínimos quadrados, aplicado à região linear da curva de sobrevivência (PENNA *et al.*, 2001, MAZZOLA *et al.*, 2003).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

Os microrganismos testados foram comprados da ATCC (*American Type Culture Collection*) e do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Meios de cultivo, ácido peracético, iodo, peróxido de hidrogênio e demais reagentes foram comprados da Sigma (St. Louis, MO). Agentes químicos testados gluconato de clorexidina, composto quaternário de amônio, glutaraldeído, formaldeído, foram gentilmente cedidos por Aster Produtos Médicos Ltda. (Sorocaba, SP), dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) foi gentilmente cedido por Johnson & Johnsons, solução comercial de Minncare®

(solução de peróxido de hidrogênio 2,2% e ácido peracético 0,45%) foi cedida por Edwards Lifesciences Macchi, compostos liberadores de cloro ativo (CRA's) foram preparados a partir de solução comercial de hipoclorito de sódio concentrada, a concentração de cloro, peróxido de hidrogênio e iodo livres foram determinadas pelo método iodométrico (BACCAN *et al.*, 1985).

3.2.2 Preparação do inóculo

As culturas foram mantidas em suspensão em meio caseína soja (TSA, Difco, Detroit, Michigan, USA) a 4°C com transferências semanais. Após 24h, as culturas desenvolvidas em TSA, a 22° C para *S. marcencens*, e a 35-37°C para *E. cloacae*, *A. calcoaceticus*, *E. coli*, *S. aureus*, foram transferidas para TSB (Difco), centrifugadas (1000g/15 min/4°C) e ressuspensas em solução salina. A viabilidade das bactérias foi estimada através de cultura em profundidade em TSA, confirmando populações em concentrações maiores que 10⁷UFC/mL.

Culturas de esporos, desenvolvidas por 6 dias em meio de esporulação, a 37°C para *B. subtilis*, e a 62°C para *B.stearothermophilus*, foram transferidas, centrifugadas (1935g for 30 min, quatro vezes), a suspensão foi mantida a baixa temperatura e em solução + de acetato de cálcio (pH=9,7) a 4°C (PENNA *et al.*, 1998). A viabilidade do choque térmico (80°C/ 10 min para *B. subtilis* e 100°C/ 20 min para *B. stearothermophilus*) esporos foram obtidos através de cultura em profundidade em TSA, confirmando populações em concentração maior que 10⁶ esporos/mL.

3.2.3 Tempo de Redução Decimal (valor D)

Tempo de redução decimal (Valor D) é definido pelo intervalo de tempo necessário para que um determinado agente químico cause decaimento de 1 ciclo logarítmico ($1 \log_{10}$, ou 90%) em uma população inicial conhecida (PENNA *et al.*, 2001).

O ensaio de determinação do valor D consiste na transferência de 1mL de uma suspensão de microrganismos de concentração conhecida para solução desinfetante teste (99 mL), mantida em agitação magnética constante em temperatura ambiente (25°C). A concentração inicial de microrganismos (N_0) submetida ao contato com agente desinfetante variou entre 10^5 - 10^6 UFC/mL, os resultados de valor D são plotados em gráfico *log UFC/mL x tempo (min)*.

Em intervalos de tempo regulares (1 minuto para células vegetativas e 5 minutos para esporo formadoras), 1 mL de amostra da mistura (agente sanitizante e suspensão de microrganismos) é transferida para 9 mL de meio de cultura (TSB estéril) (Figura 3.1.). Em seguida o número de microrganismos viável é determinado por plaqueamento em profundidade em placas de Petri estéreis com meio de cultura não seletivos (*plate count agar*, PCA), antes do plaqueamento cada um dos tubos contendo 9 mL de meio de cultura e 1 mL da mistura de agente sanitizante e microrganismos foi diluída em solução fisiológica (0,9% NaCl).

Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa à temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo, após 24h o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL foi determinado e as curvas relacionando *log UFC/mL x tempo (min)* foram montadas.

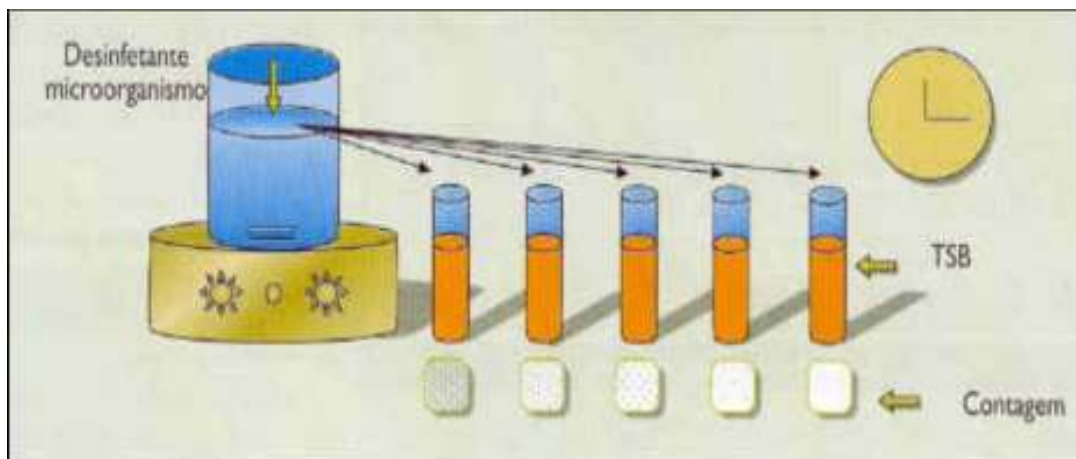


Figura 3.1. Representação do ensaio de determinação do tempo de redução decimal (Valor D).

O valor D foi então calculado pelo inverso negativo do coeficiente angular da reta média encontrada no gráfico. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados. O tempo total de exposição foi calculado como o equivalente a 6 vezes o valor D (ISO 14937, USP 24).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A classificação do espectro de atividade para cada agente sanitizante de acordo com o valor D de cada microrganismo testado facilita o estabelecimento de um programa de limpeza, desinfecção e esterilização para ambiente hospitalar (CROSHAW, 1981, ISO 11134). É importante ressaltar que não há um agente desinfetante que possa ser utilizado em todas as situações, devido às especificações de uso e a rotina pré-estabelecida (CROSHAW, 1981, ISO 11134).

Para facilitar o entendimento da eficácia de um determinado desinfetante e padronizar sua utilização no ambiente hospitalar os microrganismos testados são

aqueles mais comuns nos surtos de infecção hospitalar e os indicadores biológicos (IBs).

Os indicadores biológicos monitoram os procedimentos de desinfecção através de dois parâmetros, valor D e população inicial (N_0) (PENNA *et al.*, 2001). Para atingir *overkill* dos microrganismos a exposição aos desinfetantes parte-se da premissa que o tratamento vai inativar o *bioburden* inicial ($>10^4$ UFC/mL) e garantir segurança adicional (ISO 11134, ISO 14937). Os valores D e o fator de segurança estão na Tabela 3.1..

No geral um desinfetante deve ser capaz de reduzir 5 - $6\log_{10}$ bactérias patogênicas em um período que varia entre 5 e 10 minutos e reduzir $3\log_{10}$ bactérias patogênicas em um período de 30 segundos (RUTALA, 1995). No entanto, a eliminação de esporos necessita de um tempo de exposição longo e de agentes químicos específicos para que se atinja o intervalo de confiança necessário (redução de $12\log_{10}$).

Células vegetativas que mostraram maior resistência em solução 0,4% de clorexidina foram *E. cloacae* e *S. aureus*, os valores D destes microrganismos foi 1,5 vezes maior que aqueles determinados para *A. calcoaceticus*, *S. marcescens* e *E. coli*. Um intervalo de tempo de 3 – 4 minutos foi suficiente para reduzir 90% da população de *E. coli*, *S. marcescens* e *A. calcoaceticus*, redução de $3\log_{10}$ para as cepas vegetativas foi atingida num período de 9 -12 minutos (Tabela 3.1.).

As cepas esporoformadoras foram expostas a solução de clorexidina 2%, e *B. stearothermophilus* apresentou maior resistência (1,4 vezes maior) que *B. subtilis*, é interessante ressaltar que, no geral, não é esperado que soluções de clorexidina apresentem atividade frente a células esporoformadoras, é provável que esta atividade esteja relacionada a inativação de células vegetativas presentes na

suspensão de esporos, já que esta suspensão apresenta mistura de células vegetativas e esporos (Tabela 3.1.).

Para imersão de artigos médico e dentário invasivos os tempos de exposição necessários seriam: (i) 50 - 100 minutos em solução de clorexidina 0,4% para redução de 6-12log₁₀ no *bioburden* de células vegetativas, considerando desinfecção de baixo nível e (ii) 80 110 minutos de exposição em solução 2% de clorexidina para atingir desinfecção de alto nível (Tabela 3.1.).

Em solução de formaldeído 0,5% suspensões de *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* apresentaram valores D semelhantes, resistência duas vezes maior que *A. calcoaceticus* e *E. cloacae* e 5 vezes maior que a resistência determinada para *S. marcescens*, que foi a mais sensível.

Nos hospitais brasileiros soluções de formaldeído a 4% são consideradas desinfetantes de alto nível e são aplicadas por 24h para a desinfecção de capilares do sistema de diálise. Para desinfecção de alto nível de artigos semi-críticos emprega-se solução alcoólica de formaldeído 8% ou solução aquosa 10% por 18h. Na desinfecção de baixo nível equipamentos e artigos médicos é utilizada solução de formaldeído 4% por um período 30 minutos a 4 horas (ANVISA, 1988, 1999). A concentração recomendada de formaldeído é, no geral, dez vezes mais concentrada que a solução que foi testada, no entanto, à 0,5% de formaldeído houve redução de 12 ciclos logarítmicos (12log₁₀) nas cepas esporoformadoras em um período de tempo inferior ao recomendado pela Legislação Brasileira (ANVISA, 1988, 1999). *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* são IBs reconhecidos e em 65 minutos sofreram redução de 6log₁₀, e em 142 minutos 12log₁₀ da população inicial.

B. subtilis e *B. stearothermophilus* em solução de glutaraldeído 2% apresentaram o mesmo tempo de redução decimal (D=25 min), que é 3-4 vezes

maior que os valores D determinados para as cepas vegetativas mais resistentes (*E. coli* e *E. cloacae*). As cepas vegetativas menos resistentes foram *S. marcescens*, *A. calcoaceticus* e *S. aureus*.

Glutaraldeído é um agente químico utilizado para desinfecção de nível alto sendo capaz de reduzir a população de microrganismos esporulados, sua atividade não sofre alteração com a presença de matéria orgânica e não reage na presença de materiais sintéticos e detergentes, não é corrosivo e não coagula proteínas que estejam contaminados o material, artigo ou superfície tratada, no entanto apresenta toxicidade e pode causar irritação na pele, mucosas e olhos necessitando que o operador utilize equipamento de proteção individual (EPI). No Brasil é recomendado que soluções de glutaraldeído sejam empregadas por um período de 8-10h para esterilização (ANVISA, 1978, 1983, 1988, 1992, 1993, 1999).

Os IBs *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* foram reduzidos em $12\log_{10}$ (esterilização) após período de 5h de contacto, no caso de desinfecção de artigos semi-críticos um período de 3h seria necessário para redução de $6 \log_{10}$.

Associação de peróxido de hidrogênio (2,2%) e ácido peracético (0,45%) (Minncare[®]) foi eficaz contra microrganismos esporulados e vegetativos, sendo que *E. coli*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* apresentaram resistência 2-3 vezes maior que as cepas mais sensíveis.

Utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio (1,5%) obteve-se resultados semelhantes àqueles obtidos para a solução de Minncare[®], a presença do ácido peracético, no entanto, causa redução de 10 vezes no valor D de *B. subtilis*. *B. stearothermophilus* foi submetido ao contato com solução de peróxido de hidrogênio 26,5%, apresentando um valor D de 5 minutos (ANVISA, 1988, 1999, RUTALA, 1998).

Minnicare[®] é um produto que não apresenta odor pungente e se decompõe em subprodutos inócuos, mas é altamente corrosivo, exigindo que o operador esteja devidamente paramentado.

As soluções à base de cloro testadas foram hipoclorito de sódio (NaOCl) e dicloroisocianurato de sódio (NaDCC), desinfetantes a base de cloro reagem com matéria orgânica, e sua atividade antimicrobiana decai de acordo com a quantidade de matéria orgânica presente, desta forma a concentração de cloro disponível deve ser suficiente para agir frente aos microrganismos, mesmo que haja perda pela presença de matéria orgânica.

Para a solução inorgânica de cloro (NaOCl) o valor de pH é determinante no espectro de ação, o ácido hipocloroso (HOCl) é formado em pH 5-8 e é responsável pela atividade antimicrobiana (McDONNELL E RUSSELL, 1998). A forma dissociada (OCl⁻) predomina em pH alcalino e apresenta pouca atividade antimicrobiana, em soluções mais concentradas de hipoclorito de sódio em pH>8 tornam difícil a liberação dos compostos ativos (RUTALA, 1995).

O composto orgânico pode ser utilizado em concentrações superiores, pois apresenta decomposição e liberação de cloro ativo lentas. Sua maior estabilidade se apresenta em pH~7, devido a sua estabilidade NaDCC é de fácil manuseio e a reprodutibilidade dos ensaios é simples.

Das cepas vegetativas testadas *A. calcoaceticus* e *E. coli* foram as mais resistentes à NaDCC 0,1%, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *S. aureus* apresentaram valores D semelhantes e foram as mais sensíveis. *B. subtilis*. *B. stearothermophilus* necessitaram de 4 minutos para decaírem 1 ciclo logarítmico frente a NaDCC 0,2%.

Os valores D para os microrganismos vegetativos frente à solução de hipoclorito de sódio 0,025% (pH~7) variaram entre 4,7 – 7,5 minutos para *E. cloacae*

e *E. coli*, estes valores são semelhantes aos obtidos para a exposição à solução de 0,1% de NaDCC.

Tabela 3.1. Tempo de redução decimal (valores D) para as bactérias estudadas frente às diferentes soluções de agente químico. Estão relacionadas as concentrações dos agentes químicos, número de sobreviventes e valores D.

Solução Desinfetante	Bactéria	Concentração de Desinfetante		Sobreviventes ¹ log n	valor D (min)	² t= n x D	² t= n x D
		(%)	(mg/L)			³ n= 6-log ₁₀ (min)	n=12-log ₁₀ (min)
NaDCC (pH = 7,0)	<i>A. calcoaceticus</i>	0,1	1000	-0,17t	5,9	35,4	70,8
	<i>E. cloacae</i>	0,1	1000	-0,21t	4,7	28,2	56,4
	<i>E. coli</i>	0,1	1000	-0,17t	5,9	35,4	70,8
	<i>S. aureus</i>	0,1	1000	-0,20t	5	30	60
	<i>S. marcescens</i>	0,1	1000	-0,23t	4,3	25,8	51,6
	<i>B. stearothermophilus</i>	0,2	2000	-0,22t	4,4	26,6	53,3
	<i>B. subtilis</i>	0,2	2000	-0,26t	3,8	22,5	45
HIPOCLORITO DE SÓDIO (pH = 7,0)	<i>E. coli</i>	0,05	500	-0,16t	6,1	36,4	72,9
	<i>B. stearothermophilus</i>	0,05	500	-0,106t	9,4	56,4	112,8
	<i>B. subtilis</i>	0,05	500	-0,097t	10,3	61,8	123,6
	<i>B. stearothermophilus</i>	0,1	1000	-0,28t	3,5	20,9	41,8
	<i>B. subtilis</i>	0,1	1000	-0,31t	3,2	19,2	38,3
HIPOCLORITO DE SÓDIO (pH = 7,0)	<i>A. calcoaceticus</i>	0,025	250	-0,16t	6,2	37,3	74,6
	<i>E. cloacae</i>	0,025	250	-0,13t	7,5	44,8	89,6
	<i>E. coli</i>	0,025	250	-0,13t	7,5	45,1	90,1
	<i>S. aureus</i>	0,025	250	-0,21t	4,7	27,9	55,8
	<i>S. marcescens</i>	0,025	250	-0,149t	6,7	40,1	80,2
	<i>B. stearothermophilus</i>	0,025	250	-0,041t	24	144	288
	<i>B. subtilis</i>	0,025	250	-0,048t	20,6	123,6	247,2
GLUTARALDEÍDO (pH = 7,4)	<i>A. calcoaceticus</i>	2	20000	-0,21t	4,7	28,2	56,4
	<i>E. cloacae</i>	2	20000	-0,15t	6,7	40,2	80,4
	<i>E. coli</i>	2	20000	-0,14t	7,1	42,6	85,2
	<i>S. aureus</i>	2	20000	-0,17t	5,9	35,4	70,8
	<i>S. marcescens</i>	2	20000	-0,20t	5	30	60
	<i>B. stearothermophilus</i>	2	20000	-0,04t	25	150	300
	<i>B. subtilis</i>	2	20000	-0,04t	25	150	300
FORMALDEÍDO (pH = 6,5)	<i>A. calcoaceticus</i>	0,5	5000	-0,19t	5,2	31,2	62,4
	<i>E. cloacae</i>	0,5	5000	-0,22t	4,5	27	54
	<i>S. marcescens</i>	0,5	5000	-0,48t	2,1	12,6	25,2
	<i>B. stearothermophilus</i>	0,5	5000	-0,10t	10,9	65,4	130,8
	<i>B. subtilis</i>	0,5	5000	-0,13t	11,8	70,8	141,6

CLOREXIDINA (pH = 6,2)	<i>A. calcoaceticus</i>	0,4	4000	-0,24t	4,1	24,6	49,2
	<i>E. cloacae</i>	0,4	4000	-0,12t	8,3	49,8	99,6
	<i>E. coli</i>	0,4	4000	-0,34t	3	18	36
	<i>S. aureus</i>	0,4	4000	-0,17t	5,9	35,4	70,8
	<i>S. marcescens</i>	0,4	4000	-0,25t	4	24	48
	<i>B. stearothermophilus</i>	2	20000	-0,11t	9,1	54,6	109,2
	<i>B. subtilis</i>	2	20000	-0,15t	6,7	40,2	80,4
MINNCARE ⁵ (pH = 2,3)	<i>A. calcoaceticus</i>	1	10000	-0,30t	3,4	20,4	40,8
	<i>E. cloacae</i>	1	10000	-0,29t	3,5	21	42
	<i>E. coli</i>	1	10000	-0,15t	6,7	40,2	80,4
	<i>S. aureus</i>	1	10000	-0,25t	4	24	48
	<i>S. marcescens</i>	1	10000	-0,28t	3,6	21,6	43,2
	<i>B. stearothermophilus</i>	1	10000	-0,11t	9,1	54,6	109,2
	<i>B. subtilis</i>	1	10000	-0,17t	5,9	35,4	70,8
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (pH = 3,3)	<i>E. cloacae</i>	1,5	15000	-0,56t	1,8	10,8	21,6
	<i>E. coli</i>	1,5	15000	-0,31t	3,2	19,2	38,4
	<i>S. aureus</i>	1,5	15000	-0,30t	3,4	20,4	40,8
	<i>B. stearothermophilus</i>	26,5	265000	-0,21t	4,7	28,2	56,4
	<i>B. subtilis</i>	1,5	15000	-0,02t	55,2	331,2	662,4

Legenda

¹ Curva de sobrevivência: $\log N_t = \log N_0 - 1/D \times t$; $N_0 = \text{bioburden}$; $N_t =$ população sobrevivente.

² $t = n \times D$, em que: $t =$ tempo de exposição total (min); $n = \log_{10}$ ciclos reduzidos

³ $t = n^*D$ e $n = 6 - \log_{10}$, $t =$ tempo de exposição para redução de $6 - \log_{10}$ no *bioburden* (N_0)

⁴ $t = n^*D$ e $n = 12 - \log_{10}$, $t =$ tempo de exposição para redução de $12 - \log_{10}$ no *bioburden* (N_0)

⁵ MINNCARE = 0.45 % ácido peracético + 2.2 % peróxido de hidrogênio

3.4 CONCLUSÕES

Um processo de desinfecção eficaz depende da seleção correta de agentes químicos em associação com um procedimento adequado de aplicação. É necessário portanto, que sejam compreendidas as necessidades específicas de um determinado artigo, ambiente, superfície bem como as características dos agentes químicos a serem empregados.

Este estudo estabelece que as suspensões estudadas são indicação da eficácia de desinfecção recomendada pela legislação (ANVISA, 1988, 1999), mas os resultados podem variar de produto para produto.

Para desinfecção de mãos clorexidina pode ser utilizada, pois apresentou valores D baixos. Para desinfecção de nível intermediário de equipamentos e instrumentos recomenda-se a utilização de NaDCC, devido à estabilidade e baixo efeito corrosivo para equipamentos e materiais. Para itens críticos soluções de peróxido de hidrogênio e ácido peracético podem ser empregadas. Glutaraldeído, apesar de muito aceito para processos esterilizantes, tem eficácia comparável a soluções de formaldeído, e ambas podem ser aplicadas por períodos inferiores do que se recomenda.

O efeito esperado das formulações demonstra que os agentes testados podem ser recomendados para desinfecção, mas é necessário que sejam estabelecidas rotinas de limpeza, desinfecção e esterilização de acordo com o produto, área ou artigo a ser tratada.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EM ÁGUA POTÁVEL E PURIFICADA DURANTE O MONITORAMENTO DE SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA

4.1 INTRODUÇÃO

A água é um dos elementos mais importantes e indispensáveis na manutenção da vida na Terra e renovação celular, representa 70% do corpo humano, é parte dos tecidos corporais, transporte de diversas substâncias através do organismo. Apesar disso as reservas naturais de água estão sendo cada vez mais poluídas, veiculando doenças e ameaçando a vida de populações inteiras (SABESP on line, acessado em Julho de 2002).

Água é essencial também nas indústrias farmacêuticas, em hospitais e centros de saúde, na preparação e administração de medicamentos e outros produtos relacionados à saúde. Na maioria dos casos, a água é incorporada ou utilizada durante o processamento, ou ainda é utilizada na limpeza e higienização de ambientes e equipamentos.

Potabilidade não assegura que a água possa ser empregada em instalações industriais, equipamentos, preparação de medicamentos e alimentos, cosméticos, ou ainda que seja utilizada para desinfecção e esterilização de ambientes em hospitais, berçários e outros centros de saúde. Por este motivo toda planta industrial de produtos farmacêuticos e outros produtos relacionados com saúde devem ser capazes de produzir água tratada ou de consumir água tratada de uma fonte confiável, e que atenda os requisitos estabelecidos de acordo com o que está sendo produzido. Além disso, é importante que haja controle rigoroso na estocagem e

distribuição interna da água, esse procedimento deve garantir suprimento de acordo com o volume necessário e com a qualidade em cada ponto de distribuição.

Água purificada é obtida a partir da água potável, através de um sistema de purificação de água e o produto final deve estar de acordo com os padrões determinados pelo Ministério da Saúde (ANVISA, 1978) e ser validada (USP24), segundo o quadro abaixo.

Quadro 4.1. Padrão de qualidade de água purificada e água para injeção (*water for injection* – WFI)

	Água Purificada	Água para Injeção
Condutividade	< 1,3 $\mu\text{S/cm}$ (25°C)	< 1,3 $\mu\text{S/cm}$ (25°C)
Concentração de Carbonos Totais (TOC)	< 0,5 ppm	< 0,5 ppm
Bactéria	100 CFU/mL	10 CFU/mL
Endotoxina	Não especificada	< 0,25 EU/mL

Um sistema de purificação de água que armazena, estoca e circula produto final purificado é susceptível a formação de biofilmes de microrganismos que representa uma fonte indesejável de microrganismos e endotoxinas. O biofilme alberga microrganismos e dificulta a ação de agentes químicos sanitizantes, além de aumentar os níveis de TOC, estas contaminações afetam todo o processo de fabricação de uma indústria farmacêutica ou de ambiente hospitalar, portanto os sistemas de purificação de água necessitam de desinfecção e sanitização periódicas, assegurando a qualidade microbiológica da água, ou seja 500 UFC/mL em água potável, 100 UFC/mL em água purificada, 10 UFC/mL de água para injeção (*water for injection* - WFI), os limites de endotoxinas são estabelecidos em <1,0 unidade de endotoxina (UE)/mL de água purificada, <0,5 UE/mL de WFI e <0,25 UE/mL de água estéril (USP24). Não há especificação dos níveis tolerados de microrganismos Gram-negativos não fermentadores, tais como *Pseudomonas sp.*, que são uma das principais causas da formação de biofilmes (SCHRECKENBERGER *et al.*, 1999).

Durante o funcionamento de um sistema de tratamento de água, os objetivos do presente trabalho são: (i) monitorar cada estágio do tratamento, (ii) caracterizar e identificar os microrganismos isolados em cada etapa, (iii) avaliar a concentração inibitória mínima dos agentes sanitizantes testados, frente aos microrganismos isolados e às cepas padrão, que serão a referência do estudo. Os agentes químicos empregados no sistema com objetivo de acerto de pH, ou como declorinantes também serão testados para avaliar sua influência nos microrganismos identificados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

Os microrganismos selvagens isolados e testados foram: *Pseudomonas picketti*; *Pseudomonas diminuta*; *Flavobacterium aureum*; *Pseudomonas fluorescences*; *Acinetobacter lwoffii*; *Pseudomonas alcaligenes* e *P. aeruginosa*.

Os agentes químicos testados foram selecionados de acordo com seu emprego nas etapas de purificação da água. Foram eles: ácido cítrico 0,5%; ácido clorídrico 0,5%; álcool etílico 70%; bissulfito de sódio 0,5%; hidróxido de sódio 0,5%; hipoclorito de sódio 0,5% (em diversos valores de pH: 7,1; 8,5 e 11) e solução comercial de peróxido de hidrogênio 2,2% e ácido peracético 0,45% (PENNA, *et al.* 2002).

4.2.2 Métodos

Amostras de água de treze pontos de distribuição (Figura 4.1.) foram analisadas em triplicata, as amostras foram filtradas em filtro de purificação USFilter (Warrendale, PA, EUA). Antes da amostragem os pontos foram limpos com solução

de álcool 70%, em seguida a válvula foi mantida aberta por 1 minuto, e então as amostras foram colhidas em sacos de polietileno (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os microrganismos foram isolados e em seguida identificados através de prova de indol, oxidase, coloração de Gram, *kit* de identificação BBL Crystal e api20NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fr) (ANVISA, 2001, MOOLENAOR E CRUTCHER, 2000, SCHRECKENBERGER *et al.*, 1999).



Figura 4.1. Fluxograma do sistema de tratamento de água estudado, com os treze pontos de amostragem representados.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para cada agente químico foi realizada utilizando-se o método clássico de diluição sucessiva. Em doze tubos com rosca (10 x 100 mm) numerados distribuiu-se 1mL de meio de cultura TSB (*trypt soy broth*) para cada tubo exceto para o tubo número 1. Autoclava-se os tubos sob pressão constante e temperatura de 121° C. Para o primeiro e o segundo

da série adicionar 1 mL da solução do agente químico sanitizante em teste, agitar o tubo 2 e transferir 1 mL para o tubo 3. Repetir a transferência sucessiva até o tubo 11. Adiciona-se em todos os frascos exceto para o de número 11 o inóculo (microrganismo em teste) em um volume de 0,1 mL e concentração conhecida. Incubar a temperatura ótima de crescimento por 24 e 48h. Proceder à leitura, o CIM é o tubo de maior diluição onde se verifica a ausência de crescimento bacteriano. Os tubos 11 e 12 são os controles positivo (TSB + inóculo) e negativo (TSB + antimicrobiano) (PENNA *et al.*, 2001, MAZZOLA *et al.*, 2003).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos treze pontos amostrados foram isoladas 78 colônias, com diferentes aspectos. Todas as colônias foram confirmadas como sendo bactérias não-fermentadoras e Gram-negativas. Após isolamento as bactérias foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*, todas consideradas patógenos oportunistas comuns em solos, águas, plantas, animais e material orgânico em decomposição. Estes microrganismos também são encontrados com frequência em sistemas de tratamento de água, demonstrando serem adaptáveis a ambientes com pouco nutriente e em temperaturas que podem variar de 4 a 42°C (SCHERECKENBERGER *et al.*, 1999). De acordo com os *kits* de identificação os microrganismos isolados estão listados no Tabela 4.1.

Após a identificação os microrganismos isolados *in house* foram testados frente aos agentes químicos empregados no sistema de purificação de água (Quadro 4.2).

Tabela 4.1.: Microrganismos isolados nos treze pontos de amostragem após identificação em quantidade e porcentagem (%) do total.

Microrganismos	UFC/mL	% de identificação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	32.05
<i>Pseudomonas picketti</i>	18	23.08
<i>Pseudomonas vesiculares</i>	10	12.82
<i>Pseudomonas diminuta</i>	09	11.54
<i>Flavobacterium aureum</i>	05	6.42
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	04	5.13
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	02	2.56
<i>Pseudomonas putida</i>	02	2.56
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	01	1.28
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	01	1.28
<i>Flavobacterium multivorum</i>	01	1.28
Contagem Total	78	100.0

A concentração inibitória mínima foi determinada e os resultados expressos em valor de porcentagem e concentração mg/L e estão expressos no Quadro 4.2.

Quadro 4.2: Agente químico, concentração (%), valor de pH, ponto de aplicação, tempo de contato e função no sistema de purificação de água.

Agente Químico	Concentração (%)	pH	Ponto de Aplicação	Tempo de Contato (min)	Função no Sistema
Peróxido de hidrogênio e ácido peracético	2,2+0,45	2,1	Osmose reversa e deionização	180	Desinfetante
Álcool etílico	70,0	7,2	Pontos de amostragem	1	Desinfetante
Hipoclorito de sódio	0,5	11,9	Tanque de armazenamento e <i>loop</i> de distribuição	60	Desinfetante
Bissulfito de sódio	1,0	4,0	Filtros multimeios, abrandadores, filtro de carvão	90	Declorinação
Hidróxido de sódio	0,4	12,8	Osmose reversa e deionização contínua	30	Ajuste de pH
Ácido cítrico	0,5	2,4	Osmose reversa	30	Ajuste de pH
Ácido clorídrico	0,5	0,3	Deionização	30	Ajuste de pH

P. aeruginosa demonstrou maior CIM frente à solução de álcool etílico 70%, sendo duas vezes maior que a concentração inibitória mínima encontrada para *B.*

subtilis e *B. stearothermophilus* (8,75%) reportados por PENNA e colaboradores (2001), este resultado enfatiza a importância da validação de sistemas de tratamento de água.

TRAUMANN *et al.*, (2001) não obteve resultados aceitáveis por cloração ou filtração para eliminação de *P. aeruginosa*, no entanto em ambiente hospitalar os mesmos autores não isolaram este microrganismos das mãos da equipe quando higienizadas com solução de álcool 70% antes e depois de contato com o paciente.

Frente a soluções de hipoclorito de sódio (0,5%, pH 12) todos os microrganismos testados apresentaram a mesma CIM (0,25%). De acordo com PENNA *et al.*, (2001) *E. coli* apresentou CIM equivalente a 0,156%, equivalente a metade do que foi determinado para *P. aeruginosa*. Este resultado reforça a necessidade de haver controle de contaminates Gram-negativos em águas, mesmo que cloradas, de piscinas, encanamentos. É importante que se estabeleça um procedimento adequado, bem como tempo e concentração ideal do agente clorado para aumento da eficiência do sistema de desinfecção.

A determinação da CIM da associação de ácido peracético (0,45%) e peróxido de hidrogênio (2,2%) (Minncare[®]) resultou em 0,11 – 0,55% de peróxido de hidrogênio para *P. aeruginosa*, *P. picketti*, *F. aureum* e *A. lwoffii*. Os demais microrganismos apresentaram CIM duas (*P. diminuta*), quatro (*P. alcaligenes*) e oito (*P. fluorescences*) vezes menores.

P. fluorescens e *P. alcaligenes* foram as cepas mais sensíveis frente a hidróxido de sódio (0,4%, pH 12,8), com concentração inibitória mínima de 0,15%. A principal função deste agente químico no sistema é ajuste de pH da água proveniente do sistema de osmose reversa e deionização contínua, mas apresenta atividade antimicrobiana, como fica demonstrado pelos ensaios realizados.

Ácido cítrico (0,5%, pH 12,8) é empregado como agente químico para ajuste de valor de pH na osmose reversa e da água que é empregada na limpeza antes da utilização da solução de ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Dentre os microrganismos testados o mais resistente foi *P. picketti* (CIM 0,5%) e a mais sensível foi *A. lwoffii* (CIM 0,06%).

Ácido clorídrico (0,3%, pH 3) também faz parte dos agentes químicos utilizados no sistema de tratamento de água para ajuste de pH, no entanto exerce alguma atividade antimicrobiana, *A. lwoffii* (CIM 0,039%) sendo a menos resistente e *P. fluorescens* (CIM 0,078%) a mais resistente.

P. aeruginosa não foi afetada pelo contato com hidróxido de sódio, ácido cítrico e ácido clorídrico, e mesmo essas soluções tendo como principal função ajustes no sistema, há sempre atividade antimicrobiana relacionada.

Bissulfito de sódio (0,5%, pH 4) tem a função de decolorar a água para preservar os filtros multimeios, também é empregado nos abrandadores e nos leitos de carvão ativo, seu contato com os microrganismos testados resultou em CIM de 0,0078% em todos os casos.

Tabela 4.2. Valores de concentração inibitória mínima para os principais microrganismos isolados e identificados no sistema de tratamento de água frente a agentes químicos empregados em diversas etapas da purificação da água.

Bactéria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Pseudomonas diminuta</i>		<i>Pseudomonas picketti</i>		<i>Flavobacterium aureum</i>		<i>Acinetobacter lwoffii</i>	
	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
Acido cítrico	2500	0,25	2500	0,25	5000	0,5	2500	0,25	600	0,06
Acido clorídrico	1560	0,16	1560	0,16	3125	0,31	1560	0,16	390	0,03
Bissulfito de Sódio	780	0,078	780	0,078	780	0,078	780	0,078	780	0,07
Etanol	175000	17,5	87500	8,75	87500	8,75	87500	8,75	87500	8,75
Hidróxido de Sódio	3000	0,3	1500	0,15	3000	0,3	3000	0,3	4000	0,4
Hipoclorito de Sódio	2500	0,25	2500	0,25	2500	0,25	2500	0,25	2500	0,25
Peróxido de Hidrogênio + Ácido Peracético	5000	0,50	2500	0,25	5000	0,50	5000	0,50	5000	0,50

4.4 CONCLUSÕES

Água utilizada em centros de saúde e indústrias farmacêuticas deve ser analisada periodicamente como medida preventiva contra a contaminação por microrganismos, facilitando assim melhorias no sistema de tratamento e purificação de água.

Análise de água para bactérias heterotróficas, incluindo *Pseudomonas*, é válida para a prevenção da formação de biofilme e redução da concentração de pirogênio.

Muitos tipos de superfície podem albergar biofilme, no sistema de purificação de água quase todas as superfícies estão sujeitas a este problema. Superfícies porosas encontradas nas resinas de deionização e nas membranas de osmose reversa constituem uma oportunidade excelente de armazenamento de matéria orgânica e bactérias que vão iniciara formação de biofilme. Agentes clorados não são eficazes na remoção de biofilme, mas são muito eficazes para manter o número de microrganismos baixo nos tanques de armazenamento e no *loop* de distribuição de água. Peróxido de hidrogênio e outros agentes químicos que contém peróxidos e ácido peracético na sua composição são muito efetivos na prevenção e remoção de biofilmes em um período curto de exposição (1 - 2 minutos), e não são corrosivos.

Esta pesquisa enfatiza a necessidade de monitoramento contínuo do sistema de purificação de água, incluindo a avaliação da remoção efetiva das bactérias Gram-negativas não fermentadoras, com atenção especial para *Pseudomonas sp* que apresentou resistência elevada frente aos agentes químicos testados. Uma das alternativas para a melhoria do efeito dos agentes químicos empregados na limpeza e sanitização seria o aumento do tempo de exposição ao agente químico.

Hipoclorito de sódio 0,5% foi eficiente na redução da população de microrganismos ($6\log_{10}$) após 18h de contato. Como todos os microrganismos testados apresentaram mesmo valor de concentração inibitória mínima o tempo de contato de 60 minutos desta solução com o tanque de abastecimento de água talvez devesse ser aumentado para minimizar o número de microrganismos que são introduzidos inicialmente no sistema.

No *loop* de distribuição de água o tempo de contato com hipoclorito de sódio deveria ser maior para minimizar o número de microrganismos que chegariam aos pontos de consumo. Alternativamente, o *loop* de distribuição poderia ser sanitizado com ácido peracético e peróxido de hidrogênio, e em seguida sanitizado com NaOCl para prevenir a sobrevivência de microrganismos viáveis. Deste modo o tempo de contato dos agentes sanitizantes com os diferentes pontos do sistema deveriam ser revistos, visando a melhor utilização dos mesmos.

A aplicação da solução de ácido peracético e peróxido de hidrogênio nas membranas de osmose reversa exige maior tempo de contato desta solução nas colunas de deionização (ponto anterior do sistema, ver Figura 4.1.) onde há contagem elevada de microrganismos.

Hidróxido de sódio, ácido clorídrico e ácido cítrico são empregados como adjuvantes químicos no sistema, com a função principal de acerto de valor de pH, nas concentrações empregadas não é esperada atividades antimicrobiana, no entanto alguma atividade foi reportada.

Lavar os reservatórios de água, colunas de deionização, membranas de osmose reversa e sanitizar os circuitos de distribuição são medidas determinantes na garantia da qualidade do produto final.

CAPÍTULO V
DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS
FRENTE A DIFERENTES AGENTES SANITIZANTES EMPREGADOS NO
SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA

5.1 INTRODUÇÃO

Água é um dos elementos mais importantes na indústria farmacêutica, sendo empregada como excipiente, na reconstituição de produtos, síntese, na produção ou produto final e ainda na limpeza de equipamentos, ambientes e no processo de embalagem (EPEA, 2002). Água purificada também é utilizada com frequência como componente principal em várias soluções farmacêuticas e desinfecção de artigos semi-críticos em ambiente hospitalar e centros de saúde, ainda é o componente principal em soluções de diálise peritoneal, nutrição enteral (inclusive para recém-nascidos).

Diferentes níveis de qualidade de água são necessários de acordo com a utilização, deste modo, é importante que seja feito um controle de qualidade rigoroso, especialmente microbiologicamente. O papel fundamental exercido pela água justifica o volume de recursos destinados ao desenvolvimento e manutenção do sistema de purificação de água.

Por este motivo toda planta industrial de produtos farmacêuticos e outros produtos relacionados com saúde devem ser capazes de produzir água tratada ou de consumir água tratada de uma fonte confiável, e que atenda os requisitos estabelecidos de acordo com o que está sendo produzido. Além disso, é importante que haja controle rigoroso na estocagem e distribuição interna da água, esse procedimento deve garantir suprimento de acordo com o volume necessário e com a qualidade em cada ponto de distribuição.

Água potável pode ser empregada em sínteses químicas e nos estágios iniciais de limpeza na linha de produção da indústria farmacêutica, salvo recomendação contrária que exija maior grau de pureza da água. Água para injeção é utilizada para a preparação de medicamentos para administração parenteral tanto na diluição quanto como veículo. Água purificada é empregada na limpeza de equipamentos médicos antes da esterilização e preparação de medicamentos que não exijam água apirogênica ou estéril.

Água purificada é obtida através da purificação de água proveniente de poços artesianos e de fontes de água potável. O sistema de purificação de água consiste de uma série de operações unitárias (ver fluxograma, Figura 1) que atendem aos requisitos estabelecidas (ANVISA, 1978, 1990).



Figura 5.1. Fluxograma do sistema de tratamento de água estudado, com os treze pontos de amostragem representados.

Sistemas de purificação de água devem ser validados de acordo com a Farmacopéia Americana (USP 24) (ver Quadro 5.1.), evitando a formação de pirogênio. O padrão bacteriológico exige que a concentração de unidades de

endotoxina (EU/mL) seja menor ou igual a 1 para que o padrão de esterilidade seja atingido antes da autoclavação.

Quadro 5.1. Padrão de qualidade de água purificada e água para injeção (*water for injection* – WFI)

	Água Purificada	Água para Injeção
Condutividade	< 1,3 $\mu\text{S/cm}$ (25°C)	< 1,3 $\mu\text{S/cm}$ (25°C)
Concentração de Carbonos Totais (TOC)	< 0,5 ppm	< 0,5 ppm
Bactéria	100 CFU/mL	10 CFU/mL
Endotoxina	Não especificada	< 0,25 EU/mL

Um sistema de purificação de água que armazena, estoca e circula produto final purificado é susceptível para formação de biofilmes de microrganismos que representa uma fonte indesejável de microrganismos e endotoxinas. O biofilme alberga microrganismos e dificulta a ação de agentes químicos sanitizantes, além de aumentar os níveis de TOC, estas contaminações afetam todo o processo de fabricação de uma indústria farmacêutica ou de ambiente hospitalar, portanto os sistemas de purificação de água necessitam de desinfecção e sanitização periódicas, assegurando a qualidade microbiológica da água, ou seja 500 UFC/mL em água potável, 100 UFC/mL em água purificada, 10 UFC/mL de água para injeção (*water for injection* - WFI), os limites de endotoxinas são estabelecidos em <1,0 unidade de endotoxina (UE)/mL de água purificada, <0,5 UE/mL de WFI e <0,25 UE/mL de água estéril (USP24). Não há especificação dos níveis tolerados de microrganismos Gram-negativos não fermentadores, tais como *Pseudomonas sp.*, que são uma das principais causas da formação de biofilmes (SCHRECKENBERGER *et al.*, 1999).

O biofilme aumenta a carga microbiana presente no sistema e contribui para o aumento no número de partículas, microrganismos e nível de carbonos totais (TOC). Contaminação pode comprometer todo o processo produtivo na indústria

farmacêutica e por isso deve haver controle e monitoramento microbiológico de todo processo para satisfazer os parâmetros de qualidade microbiológica (USP 28).

Para bactérias fermentadoras Gram-negativas em água potável os padrões determinam que o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL deve ser inferior a um em 100 mL. As leis brasileiras (ANVISA, 1978, 1990) e a normatização internacional (USP 24) não esclarecem os níveis aceitáveis de bactérias fermentadoras Gram-negativas, tais como *Pseudomonas*, que representam a maior fonte de formação de biofilmes e endotoxinas em água purificada (SCHRECKENBERGER *et al.*, 1999).

O objetivo desta pesquisa é analisar a resistência de microrganismos isolados de um sistema de purificação de água (microrganismos denominados *in house*, para facilitar a compreensão), e comparar com a resistência de microrganismos padrão, avaliando se o regime de desinfecção empregado atualmente no sistema de purificação de água é eficaz frente aos microrganismos estudados, enfatizando as implicações da validação microbiológica do processo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

O artigo anterior (PENNA *et al.*, 2002) reporta os microrganismos isolados e identificados nos treze pontos de amostragem (Figura 5.1) do sistema de purificação de água. Os microrganismos selvagens isolados e testados foram: *Pseudomonas picketti*; *Pseudomonas diminuta*; *Flavobacterium aureum*; *Pseudomonas fluorescences*; *Acinetobacter lwoffii*; *Pseudomonas alcaligenes* e *P. aeruginosa* (PENNA, *et al.* 2002). Os microrganismos padrão escolhidos para efeito de comparação foram: *Pseudomonas diminuta* ATCC 11568, *Pseudomonas alcaligenes*

INCQS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 3178, *Pseudomonas picketti* ATCC 5031, *Bacillus subtilis* ATCC 937 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Os agentes químicos testados foram selecionados de acordo com seu emprego nas etapas de purificação da água. Foram eles: ácido cítrico 0,5%; ácido clorídrico 0,5%; álcool etílico 70%; bissulfito de sódio 0,5%; hidróxido de sódio 0,5%; hipoclorito de sódio 0,5% (em diversos valores de pH: 7,1; 8,5 e 11) e solução comercial de peróxido de hidrogênio 2,2% e ácido peracético 0,45% (Quadro 5.2.) (PENNA, *et al.* 2002).

Quadro 5.2.: Agente químico, concentração (%), valor de pH, ponto de aplicação, tempo de contato e função no sistema de purificação de água.

Agente Químico	Concentração (%)	pH	Ponto de Aplicação	Tempo de Contato (min)	Função no Sistema
Peróxido de hidrogênio e ácido peracético	2,2+0,45	2,1	Osmose reversa e deionização	180	Desinfetante
Álcool etílico	70,0	7,2	Pontos de amostragem	1	Desinfetante
Hipoclorito de sódio	0,5	11,9	Tanque de armazenamento e <i>loop</i> de distribuição	60	Desinfetante
Bissulfito de sódio	1,0	4,0	Filtros multimeios, abrandadores, filtro de carvão	90	Decloração
Hidróxido de sódio	0,4	12,8	Osmose reversa e deionização contínua	30	Ajuste de pH
Ácido cítrico	0,5	2,4	Osmose reversa	30	Ajuste de pH
Ácido clorídrico	0,5	0,3	Deionização	30	Ajuste de pH

5.2.2 Métodos

Amostras de água de treze pontos de distribuição (Figura 5.1) foram analisados em triplicata, e as amostras foram filtradas em filtro de purificação USFilter (Warrendale, PA, EUA). Antes da amostragem os pontos foram limpos com solução de álcool 70%, em seguida a válvula foi mantida aberta por 1 minuto, e

então as amostras foram colhidas em sacos de polietileno (Millipore, Bedford, MA, EUA).

5.2.3 Tempo de Redução Decimal (valor D)

Tempo de redução decimal (Valor D) é definido pelo intervalo de tempo necessário para que um determinado agente químico cause decaimento de 1 ciclo logarítmico ($1 \log_{10}$, ou 90%) em uma população inicial conhecida (PENNA *et al.*, 2001).

O ensaio de determinação do valor D consiste na transferência de 1mL de uma suspensão de microrganismos de concentração conhecida para solução desinfetante teste (99 mL), mantida em agitação magnética constante em temperatura ambiente (25°C). A concentração inicial de microrganismos (N_0) submetida ao contato com agente desinfetante variou entre 10^5 - 10^6 UFC/mL, os resultados de valor D são plotados em gráfico *log UFC/mL x tempo (min)*.

Em intervalos de tempo regulares (1 minuto para células vegetativas e 5 minutos para esporo formadoras), 1 mL de amostra da mistura (agente sanitizante e suspensão de microrganismos) é transferida para 9 mL de meio de cultura (TSB estéril). Em seguida o número de microrganismos viável é determinado por plaqueamento em profundidade em placas de Petri estéreis com meio de cultura não seletivos (*plate count agar*, PCA), antes do plaqueamento cada um dos tubos contendo 9mL de meio de cultura e 1 mL da mistura de agente sanitizante e microrganismos foi diluída em solução fisiológica (0,9% NaCl).

Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa à temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo, após 24h o número de unidades

formadoras de colônia (UFC)/mL foi determinado e as curvas relacionando log UFC/mL x tempo (min) foram contruídas.

O valor D foi então calculado pelo inverso negativo do coeficiente angular da reta média encontrada no gráfico. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados. O tempo total de exposição foi calculado como o equivalente a 6 vezes o valor D (ISO 14937, USP 24).

5.3 RESULTADOS

Para facilitar a compreensão da eficácia dos desinfetantes e padronização do seu uso em programas de limpeza em sistemas de purificação de água, as cepas padrão de bactérias analisadas foram consideradas indicadores biológicos (IB). Os IBs têm a função de monitorar os procedimentos de desinfecção e sua performance, a sua eficácia depende da concentração inicial de microrganismos (N_0) e valor D (ISO 14937, PENNA *et al.*, 1998). Para atingir *overkill* dos microrganismos a exposição aos desinfetantes parte-se da premissa que o tratamento vai inativar o *bioburden* inicial ($>10^6$ UFC/mL) e garantir segurança adicional (ISO 11134, ISO 14937). Tempo de redução decimal (valor D) corresponde ao número de ciclos logarítmicos reduzidos (n) no período de aplicação de cada solução desinfetante e microrganismo testado. O tempo de exposição para redução de $n=6$ de cada agente sanitizante está apresentado na Tabela 5.1, nesta mesma tabela estão apresentados os valores D para cepas *in house* e padrão, o tempo de exposição (múltiplo do valor D, considerando-se $t=nxD$, onde n é o número de ciclos

logarítmicos reduzidos da população inicial de microrganismos após tempo de contato).

Tabela 5.1. Tempo de redução decimal (valor D), número de ciclos logaritmo reduzidos (n) para o período de aplicação de cada solução desinfetante e bactéria testada. O tempo de exposição para n=6 (6log10) para cada agente químico e bactéria. A tabela está organizada com base no agente químico (5.1.1. - 5.1.7.).

Tabela 5.1.1.

ACIDO CITRICO (0,5%, 30 min)	valor D (minutos)	n= 6 log₁₀ (minutos)	n=t/D
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	1,77	10,62	16,96
<i>F. aureum</i>	15,77	94,64	1,90
<i>P. aeruginosa</i>	3,81	22,84	7,88
<i>P. alcaligenes</i>	2,99	17,96	10,02
<i>P. diminuta</i>	5,43	32,61	5,52
<i>P. fluorescens</i>	17,06	102,39	1,76
<i>P. picketti</i>	3,29	19,76	9,11
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	9,51	57,09	3,15
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7,73	46,37	3,88
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	8,95	53,72	3,35
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	4,54	27,22	6,61
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	9,50	56,98	3,16
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	5,32	31,91	5,64
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	4,35	26,08	6,90

Tabela 5.1.2.

ACIDO CLORIDRICO (pH 0.3) (5,0%, 30 min)	valor D (minutos)	n= 6 log₁₀ (minutos)	n=t/D (minutos)
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	7,26	43,57	4,13
<i>F. aureum</i>	5,67	34,03	5,29
<i>P. aeruginosa</i>	6,88	41,29	4,36
<i>P. alcaligenes</i>	5,56	33,39	5,39
<i>P. diminuta</i>	6,49	38,91	4,63
<i>P. fluorescens</i>	9,12	54,74	3,29
<i>P. picketti</i>	10,81	64,86	2,78
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	10,88	65,29	2,76
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,70	22,19	8,11
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	6,35	38,12	4,72
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	4,03	24,16	7,45
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	2,81	16,87	10,67
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	4,22	25,34	7,10
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	4,78	28,71	6,27

Tabela 5.1.3.

ALCOOL ETILICO (pH 7,2) (70,0%, 1 min)	valor D (minutos)	$2n = 6 \log_{10}$ (minutos)	$n = t/D$ (minutos)
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	6,84	41,07	6,84
<i>F. aureum</i>	6,05	36,30	6,05
<i>P. aeruginosa</i>	9,71	58,25	9,71
<i>P. alcaligenes</i>	5,92	35,50	5,92
<i>P. diminuta</i>	5,56	33,39	5,56
<i>P. fluorescens</i>	6,79	40,73	6,79
<i>P. picketti</i>	7,04	42,25	7,04
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	9,98	59,88	9,98
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,49	26,93	4,49
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	4,92	29,53	4,92
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	8,64	51,81	8,64
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	4,59	27,55	4,59
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	2,74	16,47	2,74
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	5,03	30,15	5,03

Tabela 5.1.4.

BISSULFATO DE SODIO (pH 4,0) (0,5%, 90 min)	valor D (minutos)	$2n = 6 \log_{10}$ (minutos)	$n = t/D$ (minutos)
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	4,82	28,92	18,68
<i>F. aureum</i>	3,70	22,21	24,32
<i>P. aeruginosa</i>	5,25	31,53	17,13
<i>P. alcaligenes</i>	3,50	21,00	25,71
<i>P. diminuta</i>	4,01	24,04	22,46
<i>P. fluorescens</i>	6,33	38,00	14,21
<i>P. picketti</i>	7,86	47,13	11,46
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	9,47	56,82	9,50
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,05	36,30	14,88
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	7,34	44,02	12,27
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	6,93	41,55	13,00
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	6,72	40,32	13,39
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	6,12	36,72	14,71
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	4,88	29,25	18,46

Tabela 5.1.5.

SODIUM HYDROXIDE (pH 12.8) (0,4%, 30 min)	valor D (minutos)	$n=6 \log_{10}$ (minutos)	$n=t/D$ (minutos)
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	12,21	73,26	2,46
<i>F. aureum</i>	16,23	97,40	1,85
<i>P. aeruginosa</i>	14,16	84,99	2,12
<i>P. alcaligenes</i>	11,53	69,20	2,60
<i>P. diminuta</i>	18,45	110,70	1,63
<i>P. fluorescens</i>	10,96	65,79	2,74
<i>P. picketti</i>	16,72	100,33	1,79
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	10,96	65,79	2,74
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5,16	30,94	5,82
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	5,93	35,57	5,06
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	4,28	25,67	7,01
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	5,60	33,59	5,36
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	4,50	27,00	6,67
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	4,22	25,30	7,12

Tabela 5.1.6.

SODIUM HYPOCHLORITE (pH 11.1) (0,5%, 60 min)	valor D (minutos)	$n=6 \log_{10}$ (minutos)	$n=t/D$ (minutos)
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	5,14	30,85	11,67
<i>F. aureum</i>	3,33	19,99	18,01
<i>P. aeruginosa</i>	7,91	47,43	7,59
<i>P. alcaligenes</i>	8,58	51,50	6,99
<i>P. diminuta</i>	3,98	23,89	15,07
<i>P. fluorescens</i>	7,29	43,76	8,23
<i>P. picketti</i>	5,30	31,80	11,32
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	9,32	55,92	6,44
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,52	27,10	13,28
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	4,54	27,21	13,23
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	6,54	39,27	9,17
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	6,43	38,56	9,34
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	6,32	37,93	9,49
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	6,36	38,17	9,43

Tabela 5.1.7.

PEROXIDO DE HIDROGENIO + PERACETIC ACID (pH 2.3) (2,2% + 0,45%, 180 min)	valor D (minutos)	²n= 6 log₁₀ (minutos)	³n=t/D (minutos)
Bactéria			
<i>A. lowffi</i>	4,19	25,15	42,95
<i>F. aureum</i>	4,64	27,82	38,83
<i>P. aeruginosa</i>	5,53	33,19	32,54
<i>P. alcaligenes</i>	4,87	29,23	36,95
<i>P. diminuta</i>	5,39	32,31	33,43
<i>P. fluorescens</i>	4,36	26,14	41,31
<i>P. picketti</i>	5,44	32,63	33,10
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	7,44	44,64	24,19
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,12	24,73	43,67
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	3,78	22,66	47,66
<i>P. alcaligenes</i> INCQS	6,61	39,66	27,23
<i>P. diminuta</i> ATCC 11568	5,39	32,31	33,43
<i>P. fluorescences</i> ATCC 3178	3,41	20,47	52,76
<i>P. picketti</i> ATCC 5031	2,86	17,17	62,91

¹D-value= decimal reduction time; (-1/D) = slope.

²t= n x D and n= 6 log₁₀;

t= the exposure time for a 6 log₁₀ reduction in the bioburden (No) with a defined D-value

³t= n x D, where: t=total exposure time currently used (min); D=D-value determined (min)

Ácido cítrico 0,5% foi aplicado por 30 min/25°C e reduziu 15 ciclos logarítmicos de *A. lwoffii* (D=1,77 min) e 10 ciclos logarítmicos de *P. alcaligenes* (D=2,99 min). Este tempo de contato foi suficiente para reduzir 5-8 ciclos logarítmicos nas populações de *P. aeruginosa*, *P. picketti*, *P. alcaligenes* INCQS, *P. fluorescens* ATCC 3178, *P. picketti* ATCC 5031. No entanto, *F. aureum*, *P. diminuta* e *P. fluorescences* demonstraram resistência comparável à cepa de *B. subtilis* ATCC 9372 (redução de 2-3 log₁₀). Apesar de o ácido cítrico ter demonstrado ser eficaz frente a maioria dos microrganismos testados após 30 minutos de contato, ainda houve possibilidade de crescimento microbiano. Para ser eficaz como sanitizante o tempo de contato sugerido seria de 3h30 para atingir 6log₁₀. Ácido cítrico também é utilizado em água aquecida (100 – 105°C) por 20h em reprocessamento de dialisador, nestas condições os esporos foram eliminados e a despirogenização foi alcançada, no entanto nestas condições podem ocorrer danos a determinados equipamentos, limitando o uso (FROTA E MOREIRA, 1998). Ácido cítrico é utilizado para limpeza e ajuste de pH na membrana de osmose reversa.

P. picketti e *B. subtilis* ATCC 9372 foram as cepas mais resistentes em contato com ácido clorídrico (0,5%) sofrendo redução menor que 3 ciclos logarítmicos, este resultado é importante considerando que as cepas *in house* foram tão resistentes quanto *B. subtilis* padrão, considerado padrão em desinfecção de alto nível (ISO 14937, 2000). As cepas mais sensíveis foram *E. coli* ATCC 25922 e *P. diminuta* ATCC 11568. Ácido clorídrico é utilizado para ajuste de pH na unidade de deionização contínua.

Álcool é utilizado para limpeza de superfícies externas dos pontos de amostragem, soluções alcoólicas apresentam amplo espectro de atividade contra cepas vegetativas, vírus e fungos, mas não apresentam atividade esporocida, mas

inibem a germinação de esporos, mas este efeito é reversível (McDONNELL E RUSSELL, 1999, YASUDA-YASUKU *et al.*, 1978). Devido a falta de atividade esporocida soluções alcoólicas não são utilizadas para esterilização, mas são amplamente utilizados para assepsia de mãos e limpeza de superfícies (RUTALA, 1995).

Considerando tempo de contato de 1 minuto, a solução alcoólica não foi suficiente para causar redução na população inicial de microrganismos e os valores D determinados para todas as cepas testadas foram maiores que 1 minuto, o menor valor D determinado foi 2,74 minutos para *P. fluorescens* ATCC 3178.

Para as cepas *in house*, a solução de bissulfito de sódio (0,5%) foi capaz de reduzir mais de 13 ciclos logarítmicos em 90 min (tempo de contato recomendado) dos microrganismos *P. aeruginosa* (n=14); *P. diminuta* (n=23), *P. fluorescens* (n=13), *P. alcaligenes* (n=25), *P. picketti* (n=21), *F. aureum* (n=24) e *A. lowffi* (n=18). Para cepas padrão *P. diminuta* ATCC 11568 (n=13), *P. alcaligenes* INCQS (n=16), *P. aeruginosa* ATCC 15442 (n=12), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (n=23), *P. fluorescens* ATCC 3178 (n=13), *P. picketti* ATCC 5031 (n=21), *B. subtilis* ATCC 9372 (n=9), *B. subtilis* ATCC 6633 (n=7), e *E. coli* ATCC 25922 (n=18). Bissulfito de sódio tem a função de conservar e decolorar os filtros multimeios, abrandadores e filtro de carvão, sendo efetivo para promover nível de confiança (n>6) para microrganismos padrão e selvagens (*in house*) isoladas do sistema de purificação de água.

Hipocloritos são os desinfetantes mais utilizados e mais disponíveis na forma líquida (hipoclorito de sódio) ou sólida (hipoclorito de cálcio), apresentam amplo espectro de ação, não deixam resíduos tóxicos (MERRITT *et al.*, 2000), têm boa relação custo- benefício e agem rapidamente (RUTALA, 1997). Soluções cloradas também removem microrganismos fixos ou secos e biofilmes das superfícies

(MERRITT *et al.*, 2000). Hipocloritos são empregados em centros de saúde e ambiente hospitalar com diferentes finalidades, de acordo com o artigo, ambiente, superfície e concentração (RUTALA *et al.*, 1997).

Hidróxido de sódio (0,4%) tem a função de desinfecção e de ajuste de pH na membrana de osmose reversa e deionização contínua, e causou redução 2 – 3 ciclos logarítmicos em 30 minutos de contato com *B. subtilis* ATCC 9372. No entanto, a população inicial das cepas padrão foi reduzida mais de 5 log₁₀ em 30 minutos.

P. aeruginosa (n=18), *P. diminuta* (n=15), *P. picketti* (n=13), *E. coli* ATCC 25922 (n=11), *P. aeruginosa* ATCC15442 (n=13) apresentaram maior sensibilidade na presença de hipoclorito de sódio (0,5%) por 60 min. Outros microrganismos testados sofreram redução de 6-9 log₁₀ após tempo de contato recomendado. Hipoclorito de sódio foi muito eficaz frente às cepas testadas, garantindo nível de confiança (n≥6), no entanto no sistema de purificação de água são empregadas para limpeza do tanque de armazenamento de água e no *loop* de distribuição.

A associação entre peróxido de hidrogênio (2,2%) e ácido peracético (0,45%), Minncare[®], foi a solução com maior eficácia frente aos microrganismos (*in house* e padrão), promovendo redução da população inicial de microrganismos de 24 log₁₀ para a cepa mais resistente (*B. subtilis* ATCC 9372) e 63 log₁₀ para a cepa mais sensível (*P. picketti* ATCC 5031). No sistema de purificação de água, esta solução é empregada para sanitização das membranas de osmose reversa e na unidade de deionização contínua.

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é amplamente empregado como biocida para desinfecção, esterilização e assepsia, trata-se de um líquido incolor, disponível

comercialmente em diferentes concentrações (3 - 90%), peróxido de hidrogênio se decompõe em oxigênio e água, inóculos e não-tóxicos.

Soluções de peróxido de hidrogênio são efetivas frente à vírus, bactérias, fungos e esporos bacterianos (BLOCK, 1991), em geral o efeito é maior frente à bactérias Gram-positivas, no entanto a presença de catalase ou outras peroxidases pode aumentar a tolerância do microrganismo à solução de peróxido. Efeito esporocida pode ser alcançado se são utilizadas soluções mais concentradas e por um tempo maior de contato (RUSSEL, 1991)

Ácido peracético é considerado biocida mais potente que peróxido de hidrogênio, sendo esporocida, bactericida, viruscida e fungicida em concentrações baixas (0,3%) (BLOCK, 1991). A decomposição do ácido peracético também resulta em subprodutos estáveis e seguros (ácido acético e oxigênio), e tem as vantagens de não ser degradada por peroxidases e de não perder a atividade na presença de matéria orgânica (McDONNELL E RUSSELL, 1999). Sua aplicação principal é como esterilizante à baixas temperaturas para equipamentos médicos, também podendo ser empregado para esterilização de superfícies.

5.4 DISCUSSÃO

B. subtilis ATCC 9372 é considerado cepa padrão em processos de desinfecção, assegurando nível de confiança maior que $6 \log_{10}$ dos microrganismos vegetativos. Neste estudo, *B. subtilis* ATCC 9372 apresentou mais resistência quando testado com ácido clorídrico, álcool etílico, bissulfato de sódio, hipoclorito de sódio e Minncare®.

No entanto, *B. subtilis* ATCC 9372 apresentou valor D similar a *P. picketti* frente a ácido cítrico, *P. aeruginosa* e *P. alcaligenes* frente a bissulfito de sódio, *P. diminuta* e *F. aureum* frente a hidróxido de sódio, *P. alcaligenes* e *P. fluorescens* frente a hipoclorito de sódio. No entanto, *F. aureum*, *P. fluorescens* apresentaram valor D 1,5 vez maior do que o valor D observado para *B. subtilis* frente ao ácido cítrico. As cepas isoladas *in house* apresentaram valor D até duas vezes maiores do que os determinados para *B. subtilis* ATCC 9372 frente ao hidróxido de sódio, confirmando que a validação da eficiência dos agentes químicos desinfetantes no sistema de purificação de água deve ser baseada nas bactérias Gram-negativas isoladas.

Ações preventivas devem ser tomadas periodicamente para evitar a proliferação de microrganismos na água durante o processo de purificação, estas medidas permitem a tomada rápida de decisões que garantem a melhoria do produto final.

Pseudomonas sp e outros microrganismos Gram-negativos formam biofilmes que resistem a procedimentos de desinfecção e são fonte de pirogênio, e podem ser evitadas se a água for analisada em diferentes pontos do processo de tratamento (ISO 11134).

P. aeruginosa pode ser encontrada em lesões de pele, isolada de material de uso clínico, infecções de garganta, e nas fezes de pessoas não-hospitalizadas (LEVIN *et al.*, 1995). Devido a frequência que este microrganismo está envolvido em doenças humanas, *P. aeruginosa* tem sido considerada um dos patógenos mais importantes baseado no número e tipos de infecção com as quais relacionada (SCHRECKENBERGER *et al.*, 1999).

Lavar reservatórios e sanitizar circuitos de distribuição do sistema de purificação de água devem fazer parte da rotina da planta em questão para garantia da qualidade (química e microbiológica) da água produzida.

Coliformes e outros indicadores fecais devem ser monitorados como indicadores adicionais, *E. coli* ATCC 25922, considerada indicador biológico em diferentes processos de desinfecção, apresentou valor D inferior àqueles determinados para os microrganismos isolados *in house* para a maioria dos agentes químicos testados. O monitoramento de rotina deve estabelecer procedimentos que quantifiquem bactérias heterotróficas, vírus, fungos, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

5.5 CONCLUSÕES

Microrganismos isolados do sistema de purificação de água apresentaram maior resistência aos agentes químicos desinfetantes que as cepas padrão testadas, podendo estar relacionada com o uso indiscriminado de agentes biocidas no sistema de purificação de água, promovendo seleção de microrganismos mais resistentes.

Em muitas superfícies do sistema de purificação de água pode haver formação de biofilme e portanto, aumento de carga microbiana e pirogênio. Este trabalho enfatizou a remoção de microrganismos Gram-negativos não-fermentadores, que exibiram resistência maior quando comparados aos microrganismos padrão.

O tempo de contato entre o sistema de purificação de água e os agentes químicos devem ser revisados para garantir a redução de $6\log_{10}$ do *bioburden*. Algumas medidas tais como lavar o tanque de armazenamento de água, colunas de

deionização, membrana de osmose reserva e tubulação de distribuição de água devem ser estabelecidas para garantia da qualidade do produto final.

Re-desinfecção do sistema de purificação de água será realizada para verificar a variação resistência dos microrganismos. A análise final da população microbiana nos treze pontos de amostragem é fundamental para garantir que o *bioburden* não seja maior que 10^2 UFC/mL (SCHRECKENBERGER *et al.*, 1999), especialmente antes da osmose reversa, evitando prejuízo às membranas, evitando aumento dos custos do processo.

CAPÍTULO VI

ESTABILIDADE DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE EM SOLUÇÕES DE CLORO DE DIFERENTES VALORES DE pH

6.1 INTRODUÇÃO

A proteína verde fluorescente (GFP) tem sido demonstrada como bioindicador potencial para monitorar morte celular em diferentes condições, e para investigações *in vivo* em diferentes espécies Gram-negativas e positivas (BURNETT E BEUCHAT, 2002, CHALFIE E KAIN, 1998).

A fluorescência emitida pela GFP foi reportada como indicador em tempo real e não invasivo da sensibilidade dos fungos em contato com soluções de agentes antimicrobianos (WEBB *et al.*, 1995). Outros autores demonstraram que a fluorescência da GFP decai rapidamente na presença de biocidas, correlacionando a fluorescência da proteína com a viabilidade bacteriana (CASEY E NGUYEN, 1995, KREMER *et al.*, 1995).

Duas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (CHANGSEN *et al.*, 2003) e *Mycobacterium aureum* (SRIVASTAVA *et al.*, 1998) expressando a proteína GFP demonstraram ser eficientes na detecção de atividade anti-tuberculose através da determinação da concentração inibitória mínima para antibióticos (CHANGSEN *et al.*, 2003).

ZAFER e colaboradores (2001) avaliaram soluções de glutaraldeído e peróxido de hidrogênio frente à *Mycobacterium terrae* expressando GFP como biossensor. Em soluções diluídas de germicidas, após período *lag* de recuperação, GFP emitiu fluorescência demonstrando que as células sobreviveram ao

tratamento. Quando expostas a soluções de concentração maior de germicida as células foram inativadas por completo, indicado pelo decaimento da fluorescência.

Desinfecção, limpeza, higienização ou sanitização são procedimentos que envolvem operações físicas e químicas para eliminar muitos ou todos os microrganismos patogênicos de superfícies, materiais e equipamentos médicos (ANVISA, 1988, 1999, 2001, RUSSELL, 2002), sendo essencial para melhoria de segurança de produtos de saúde e aumento a da vida de prateleira (ERKMEN, 2004).

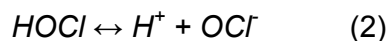
Soluções a base de cloro são as mais efetivas e amplamente utilizadas na inativação microbiana em saúde pública, hospitais e indústrias, também são utilizadas no tratamento de água potável e industrial, em sistemas de distribuição e reservatórios.

Soluções de cloro e seus derivados são agentes altamente oxidantes, eliminando os microrganismos por oxidação do material celular. Em comparação com outros agentes oxidantes, as soluções cloradas são as mais efetivas em baixas concentrações e têm o maior espectro de ação (GOEL E BOUWER, 2004, SON *et al.*, 2005). As formas de aplicação incluem gás cloro, soluções de hipoclorito e outros compostos clorados sólidos ou líquidos.

As soluções à base de cloro são de fácil manuseio e na presença de água sofrem hidrólise formando ácido hipocloroso, que é a forma livre que apresenta atividade antimicrobiana. Gás cloro e hipoclorito também podem ser formados, dependendo do valor de pH. Com a adição de cloro na água a seguinte reação ocorre:



Em valor de $\text{pH} > 4$, o equilíbrio se desloca para a direita, prevalecendo o ácido hipocloroso (HOCl). Em $\text{pH} < 4$, predomina a formação de cloro (Cl_2). Ácido hipocloroso se dissocia rapidamente:



Ácido hipocloroso é um ácido fraco, mas é um agente ativo em processos de desinfecção devido à ação oxidante. Em valores de pH entre 4 e 6 há maior concentração de HOCl , para valores de pH mais próximos de 5 há tendência de formação Cl_2 e HOCl é a espécie predominante, em pH 8 o íon OCl^- predomina.

Em geral, a reatividade do cloro decai com aumento no valor de pH . Sistemas de distribuição de água tratados com soluções de hipoclorito de sódio apresentam em geral pH que varia entre 6 e 10. Netas condições, ambas as formas, ácido hipocloroso e hipoclorito (OCl^-) estão presentes e denominadas resíduos de cloro livre.

Soluções desinfetantes são geralmente utilizadas em altas concentrações, se comparadas com a concentração mínima (CIM) necessária para causar redução no número de microrganismos viáveis, este fato se justifica baseado na necessidade de se alcançar morte celular rápida. Nestas concentrações (que podem ser até 1000 vezes maiores que o CIM (MAZZOLA *et al.* 2003)), é impossível haver sobrevivência de microrganismos devido ao dano celular, também não é possível que haja desenvolvimento de resistência. No entanto, em situações reais é possível que haja situações onde as bactérias serão expostas à concentrações de agente sanitizante menores que o necessário para causar injúria na célula (CHAPMAN, 2003, MEYER, 1994).

As reações de cloro com materiais inorgânicos, que causam redução, são em geral, rápidas. Matéria orgânica dissolvida também reage rapidamente com soluções

de cloro. No entanto, o tempo de contato entre o cloro e com o material submetido ao tratamento, determina a concentração ideal e o nível de desinfecção atingido.

Fatores que influenciam a eficácia de desinfecção incluem concentração do desinfetante, tempo de contato, temperatura, valor de pH, composição química da água (pura e tratada) e a presença de matéria orgânica, incluindo microrganismos e concentração de proteínas (GOEL E BOUWER, 2004). Quando o agente desinfetante é uma solução oxidante, a presença de matéria orgânica e outros contaminantes (metais de transição, tais como cobre e níquel, outros halogênios, ozônio, sólidos suspensos, pH, temperatura e outros materiais) pode catalisar a decomposição do desinfetante, agindo como competidores e reduzindo a porção livre de desinfetante que age frente aos microrganismos (BURNETT e BEUCHAT, 2002, MCDONNELL E RUSSEL, 1999).

A habilidade de uma proteína manter sua estrutura molecular e função em situações adversas tais como calor ou presença de agentes denaturantes definem a estabilidade da proteína, normalmente o processo de denaturação está relacionado com a perda da estrutura quaternária da proteína (FÁGÁIN, 1995).

A proteína verde fluorescente, que apresenta excitação máxima em 395 nm e emissão máxima em 509 nm, é um monômero compacto e globular de 27kDa, de características ácidas (pI 4,6-5,4), resistente ao calor ($T \geq 100^\circ\text{C}$) (VESSONI PENNA *et al.*, 2004a, b), pH alcalino (até 12, sendo valor de pH ótimo entre 6 e 8) (VESSONI PENNA *et al.*, 2002a, b), presença de sais, e agentes químicos (PENNA *et al.*, 2004a,b, WARD, 2006). A estabilidade da GFP pode ser relacionada com a fluorescência emitida, baseado na estrutura do fluoróforo (FÁGÁIN, 1995, MOZHAEV E MARTIEK, 1982, PENNA *et al.*, 2004a,b), a intensidade de

fluorescência pode ser quantificada rapidamente *in situ* utilizando método espectrofluorimétrico.

Neste trabalho a estabilidade da proteína verde fluorescente foi avaliada na presença de soluções cloradas diluídas em diferentes tampões e água para injeção, o comportamento da proteína, analisado através da emissão de fluorescência da GFP em contato com as diversas soluções cloradas, relacionando a perda de fluorescência e o valor final de cada solução estudada.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

A proteína verde fluorescente recombinante expressada por *Escherichia coli* foi extraída pelo método de partição em três fases (TPP) e purificada através de coluna butil de interação hidrofóbica (VESSONI PENNA *et al.*, 2002a, VESSONI PENNA *et al.*, 2002b, VESSONI PENNA *et al.*, 2004a,b). A intensidade de fluorescência da GFP extraída foi determinada em espectrofluorímetro (Shimadzu Co., Kyoto, Japão), em $\lambda_{EX}=394$ nm e $\lambda_{EM}=509$ nm). Recombinante GFP purificada (Clontech, CA, EUA), disponível comercialmente, foi utilizada para determinação de curva padrão para estimar a concentração da GFP baseada na intensidade de fluorescência (Figura 6.1.)

Para avaliar a influência do cloro (relativa ao valor de pH) na estabilidade da GFP, soluções de hipoclorito de diferentes valores de pH foram adicionadas a soluções tampão de: (i) 10mM acetato de sódio/ácido acético, pH 5; (ii) 10 mM fosfato de potássio (monobásico/dibásico; pH 6-7); (iii) 10 mM Tris-HCl (pH 8); (iv)

água para injeção (WFI), pH 7 (MilleQ, Millipore, MA, EUA). As soluções foram preparadas e os ensaios realizados à 25°C.

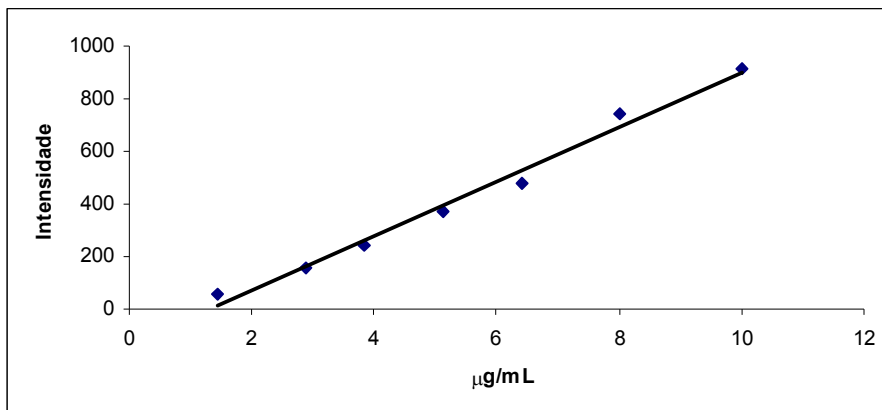


Figura 6.1. Curva de calibração da proteína GFP padrão, correlacionado intensidade de fluorescência e concentração de proteínas, $y=103,61x-134,64$ ($R^2=0,9859$), em que y representa intensidade de fluorescência e x concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$).

Após homogeneizar por 30 segundos à 25°C, o valor de pH foi determinado e a concentração total de cloro disponível foi determinada por método iodométrico (BACCAN *et al.*, 1985) antes da adição de GFP. As concentrações de cloro estudadas foram (i) 40 – 160 ppm em WFI; (ii) 10 – 70 ppm em tampão fosfato (pH 6); (iii) 20 – 100 ppm em tampão fosfato (pH 7) à 25°C. Soluções de cloro de concentrações maiores que 10 ppm foram testadas, para todas as soluções tampão, exceto tampão acetato (pH 5, em que as concentrações foram menor que 7 ppm). Ensaio anteriores demonstraram que a concentração livre de cloro e o valor de pH para estas soluções foram constantes através do ensaio com GFP (30 minutos).

O valor de pH final das soluções cloradas foram (i) pH $11,00 \pm 0,23$ para WFI, (ii) pH $6,86 \pm 0,21$ para tampão fosfato (pH 6), (iii) pH $7,15 \pm 0,08$ para tampão fosfato (pH 7), (iv) pH $5,10 \pm 0,22$ para tampão acetato (pH 5) e, (v) pH $8,17 \pm 1,55$ para soluções de Tris-HCl (pH 8). Após 30 segundos de homogeneização das soluções

de hipoclorito de sódio e os diferentes tampões, GFP foi adicionada em cada solução e o tempo de exposição foi cronometrado. O volume de GFP adicionado foi pequeno o suficiente para não causar alterações no valor de pH da solução final.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada através do método das diluições sucessivas das soluções cloradas em pH 5, 6, 7 ou 8. A proteína verde fluorescente (8-9 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada a cada amostra de solução clorada e homogeneizada por 30 segundos. A intensidade de fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro após 30 s e em intervalos de 1 até 10 minutos, com agitação contínua. A CIM foi a menor concentração de cloro que causou perda de intensidade de fluorescência após 30 segundos de contato e após 10 minutos de exposição à 25°C (Tabela 6.1.).

A partir da determinação da concentração inibitória mínima pôde-se determinar um intervalo de concentração de cloro em solução necessário para reduzir a concentração de GFP em um ciclo logarítmico. O valor D foi então calculado pelo inverso negativo do coeficiente angular da reta média encontrada no gráfico (*\log_{10} intensidade de fluorescência x tempo*). A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Alíquota de 2 mL das soluções de cloro em tampão ou WFI foram transferidas para cubeta de quartzo e colocadas no espectrofluorímetro. Em cada cubeta, foram adicionados 100 μL de GFP para obter concentração final de 8 $\mu\text{g/mL}$. Após cada adição de GFP, medidas de intensidade de fluorescência foram determinadas imediatamente e a cada 5 segundos, até 30 minutos, com e sem agitação, à 25°C. A estabilidade da GFP foi representada graficamente por *\log_{10} intensidade de fluorescência x tempo*. As curvas de primeira ordem atendem a equação:

$$\log_{10} I_f = \log_{10} I_0 - (1/D) * t \quad (3)$$

Em que, I_0 é a intensidade inicial de fluorescência de GFP e I_f é a intensidade final de fluorescência após o tempo de contato (t) com a solução clorada.

As amostras controle, nas quais GFP foi adicionada às mesmas soluções cloradas ou WFI, foram ensaiadas de maneira semelhante no mesmo intervalo de tempo, essas amostras não apresentaram, variação de intensidade de fluorescência após 30 minutos de contato (dados não apresentados).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações na intensidade de fluorescência da GFP diluídas em soluções cloradas ou WFI determinadas em espectrofluorímetro e as unidades relativas de GFP foram convertidas em valores de concentração através da curva de calibração (Figura 6.1.). A proteína verde fluorescente após denaturação não é capaz de emitir fluorescência, e a perda de intensidade de fluorescência foi empregada como parâmetro para avaliar a concentração de GFP denaturada.

É importante observar que as concentrações de cloro foram tituladas para determinar a concentração de cloro livre para reagir com a proteína. Em diferentes valores de pH a concentração de cloro livre variou de acordo com o equilíbrio das equações 1 e 2.

As soluções de cloro com GFP foram analisadas para concentração inibitória mínima, com agitação constante, como ensaios preliminares para determinar as condições ótimas de concentração de cloro para determinação do tempo de redução decimal em diferentes valores de pH, com e sem agitação. O comportamento da GFP em soluções cloradas em tampão Tris-HCl (pH 8) foram analisadas, mas os dados não foram reprodutíveis e portanto descartados.

Tabela 6.1. Concentração inibitória mínima (CIM) determinada pela perda de fluorescência nos 30 segundos de contato inicial, em 1 e 10 minutos de exposição (tempo máximo de exposição) em água (WFI) e tampão fosfato (pH 6 e 7).

Água para injeção (pH 7,00)			
Solução de cloro, pH final 11,00±0,23			
GFPuv=8,8 µ/mL			
[Cl] ppm	Perda Inicial 30 s (%)	GFPuv (µg/mL)	
		Tempo (min)	
		1	10
130-160	>90	-	-
110-120	83,7	1,6	-
110	81,8	1,6	-
100	81,3	1,6	-
90	80,3	1,7	-
80	46,7	4,7	2,4
70	30,6	6,1	4,9
60	20,5	7,0	6,0
50	20,3	7,1	6,3
40	16,7	7,4	6,7
Tampão fosfato (pH final 7,00)			
Solução de cloro, pH final 7,15±0,08			
GFPuv=8,6 mg/mL			
[Cl] ppm	Perda Inicial 30 s (%)	GFPuv (µg/mL)	
		Tempo (min)	
		1	10
100	46,4	4,6	4,6
90	50,4	4,3	4,5
80	47,9	4,5	4,6
70	42,5	4,9	5,2
60	45,6	4,7	5,1
50	39,1	5,2	5,5
40	25,6	6,4	6,5
30	25,8	6,4	6,5
20	15,3	7,3	7,0
Tampão fosfato (pH final 6,00)			
Solução de cloro, pH final pH 6,86±0,21			
GFPuv=8,1 mg/mL			
[Cl] ppm	Perda Inicial 30 s (%)	GFPuv (µg/mL)	
		Tempo (min)	
		1	10
50	44,9	4,5	3,9
40	36,3	5,2	4,6
30	36,3	5,3	4,8
20	17,5	6,7	5,9
10	16,1	6,8	6,1

As Figuras 6.2. e 6.3. representam o comportamento da GFP nas soluções cloradas em tampão acetato (pH 5) e fosfato (pH 7), sem agitação, e os resultados obtidos foram inferiores àqueles obtidos quando houve agitação.

Agitação constante resultou em solução homogênea, favorecendo a denaturação da proteína em contato com solução de cloro. A Figura 2 traz valores D duas vezes maiores para as soluções não homogeneizadas (não agitadas), a Figura 6.3. mostra que os valores D obtidos para soluções de cloro 90 ppm (pH 7) foram três vezes superiores quando o sistema não foi homogeneizado. Esta observação foi semelhante em todas as soluções testadas.

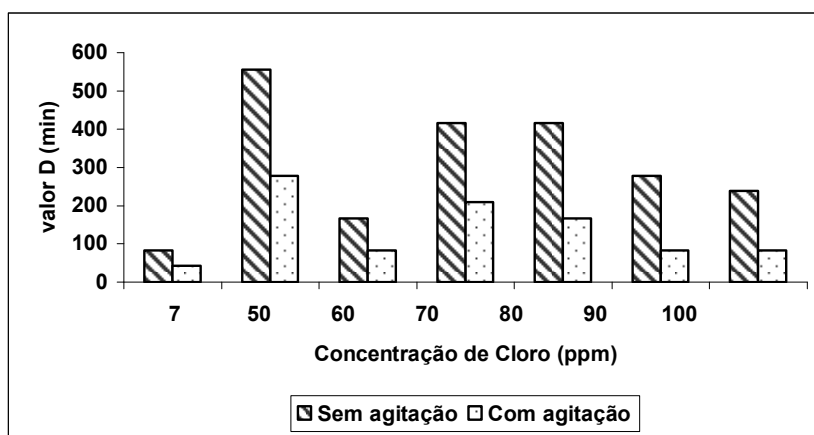


Figura 6.2. Comparação entre os valores D nas soluções de cloro tamponadas com e sem agitação à 25°C. As concentrações de cloro ensaiadas foram (i) 7 ppm em tampão acetato (pH 5,1), (ii) 50, 60, 70, 80, 90 e 100 ppm e tampão fosfato (pH 7,15±0,08).

Nas soluções sem agitação a proteína verde fluorescente recuperou a intensidade de fluorescência, o que não ocorreu quando foi mantida sob agitação constante.

Valor D pode ser utilizado como indicador de perda de estabilidade protéica, e é o tempo necessário para reduzir 90% da concentração da proteína inicial submetida à solução de cloro (PENNA *et al.*, 2004a,b). O valor D foi o parâmetro

cinético principal para comparar a influência das soluções cloradas na estabilidade da GFP.

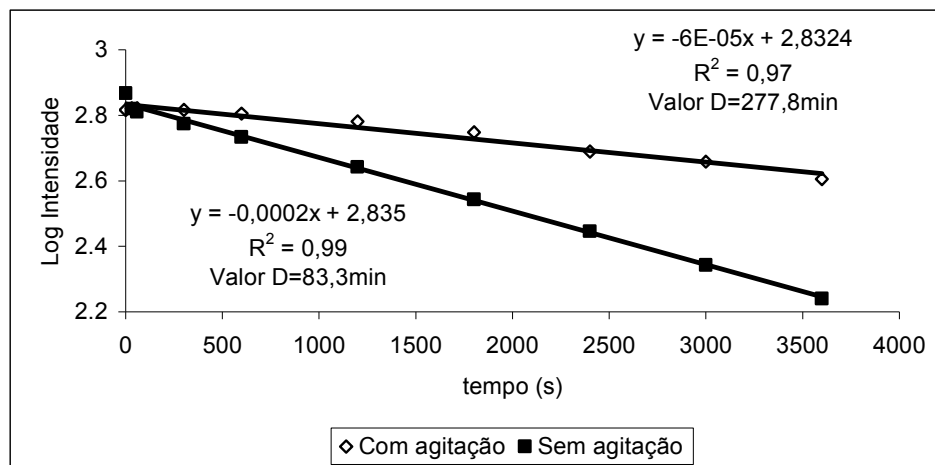


Figura 6.3. Comparação entre a intensidade de fluorescência da proteína GFP em contato com 90 ppm de cloro em tampão fosfato ($7,15 \pm 0,08$) com (■) e sem (◇) agitação à 25°C. As linhas de tendência representando a perda de fluorescência com e sem agitação foram, respectivamente, $y = -0,0002x + 2,835$ ($R^2 = 0,99$) e $y = -6 \times 10^{-5}x + 2,832$ ($R^2 = 0,97$), em que y representa o logaritmo da intensidade, e x representa tempo (min).

Tabela 6.2. Valores D obtidos das curves de redução de fluorescência (\log_{10}) para exposição de GFP às soluções cloradas de tampão fosfato (pH $6,86 \pm 0,21$) com agitação. A concentração inicial de GFP foi de $8,73 \pm 0,50$ $\mu\text{g/mL}$.

Concentração nominal de cloro (ppm)	Concentração disponível de cloro (ppm)	Valor D (min)
200	197,5	25,8
150	135,0	33,3
100	97,5	37,5
90	94,6	48,7
80	78,0	55,6
70	60,9	69,5
60	56,8	48,7
50	46,0	83,4

Nas soluções cloradas em WFI (pH $11,01 \pm 0,23$) a GFP exibiu denaturação completa nos primeiros 30 segundos de contato com as soluções de cloro de concentração maior que 130 ppm, 80% de denaturação em soluções de 90 – 120

ppm de cloro, com denaturação completa após 2 minutos de exposição (Tabela 6.2.).

Em soluções cloradas preparadas usando WFI (pH $11,01 \pm 0,23$), a concentração inibitória mínima para perda de fluorescência foi entre 100-130 ppm após 30 segundos de contato, e 90 ppm após 60 segundos de contato. A perda inicial de intensidade de fluorescência diminuiu pela metade a cada aumento de concentração de cloro em 20 ppm em WFI.

Nas concentrações de cloro 10, 20, 30, 40 e 50 ppm em soluções de tampão fosfato (pH $6,86 \pm 0,21$), a maior perda de intensidade de fluorescência (45%, a 50 ppm) ocorreu durante 30 segundos de contato e foi equivalente a perda de fluorescência de 80 ppm de cloro em WFI (pH 10,89).

O decréscimo da concentração de GFP após 10 minutos de exposição às soluções cloradas de concentração 10 – 40 ppm foi de 10%, sendo equivalente a denaturação de GFP em WFI contendo 40 - 50 ppm de cloro (pH > 10). No entanto, após 10 minutos em tampão fosfato (pH 6) a concentração de GFP decaiu em um valor 30% menor que o observado nas condições anteriores.

Em soluções de tampão fosfato pH $7,15 \pm 0,08$ de concentração 50 – 100 ppm a perda de intensidade de fluorescência após os 30 segundos iniciais variou entre 40 - 46%, a perda de intensidade de fluorescência foi de 25% à 30-40 ppm e de 15% em concentração em 20 ppm de cloro. Para soluções tamponadas de concentração entre 20 – 100 ppm de cloro a perda de intensidade de fluorescência foi constante após os 30 segundos de contato inicial.

Para solução de cloro 20 ppm em tampão fosfato (pH 7), a intensidade de fluorescência decaiu 15% nos 30 segundos iniciais, e mais 3,6% após 10 minutos de exposição, indicando estabilidade da proteína em pH 7. O mesmo comportamento foi

observado nos primeiros 5 minutos de contato da GFP com 40 ppm de cloro em WFI (pH final $11,00 \pm 0,23$) e em tampão fosfato (pH final $6,86 \pm 0,21$), já para uma solução de 10 ppm (pH final $6,86 \pm 0,21$) de cloro a perda de intensidade de fluorescência variou entre 16 – 25% respectivamente para 1 – 10 minutos de exposição.

Após 10 minutos de contato, GFP exibiu maior estabilidade em tampão fosfato (pH 7) para 20 – 100 ppm de cloro livre, equivalente a 40 -70 ppm de cloro em WFI (pH $11,00 \pm 0,23$), e 10 – 50 ppm em tampão fosfato (pH $6,86 \pm 0,21$).

A análise do decaimento da fluorescência da GFP, em tampão fosfato (pH 6), entre 24 minutos (em contato com 197,5 ppm) 83 minutos (em contato com 83 ppm), sob agitação constante não ocorreu devido à estabilidade da proteína GFP em pH $6,86 \pm 0,21$, quando há cloro livre em solução é HOCl (Tabela 6.2.). A solução de tampão acetato (pH 5,1) com 7 ppm de cloro foi suficiente para causar decaimento de 90% da intensidade inicial de fluorescência em 41,7 minutos de exposição. Sendo equivalente às concentrações entre 90 – 100 ppm em tampão fosfato (pH 6,0) e a concentrações maiores que 100 ppm (pH 7, valor $D=41,7$ minutos).

O valor D determinado para soluções de cloro em tampão acetato (pH 5) foi 100 vezes inferior se comparada a soluções de 50 ppm de cloro em tampão fosfato (pH 7, valor $D = 555,6$ min). Em pH 5, a solução de cloro contendo predominantemente a forma ativa HClO, e o pl 4,9-5,1, favorecendo a instabilidade da GFP.

Em soluções tamponadas com tampão fosfato (pH $6,86 \pm 0,21$) com 50 ppm de cloro o valor D (83,4 minutos) decaiu 1,5 vezes para a faixa de 60 – 90 ppm de cloro, e decaiu mais 1,7 vezes na faixa de 100 – 200 ppm de cloro (Tabela 6.2.). A agitação constante favoreceu contato uniforme entre a GFP e o cloro, gerando uma

correlação linear entre a perda de fluorescência e a concentração de cloro em solução.

A GFP mostrou maior resistência a denaturação em 50 ppm de cloro em tampão fosfato (pH 7,15±0,23, valor D=556 min, Tabela 6.3.). O valor D em soluções de 60 – 70 ppm de cloro decaiu pela metade, em soluções de concentração 90 -100 ppm o valor D decaiu mais 3 vezes, sendo similar ao valor D determinado para soluções de cloro 50 ppm em tampão fosfato (pH 6). Em 125 ppm, o valor D (55,6 min) foi 1,5 vezes menor, se comparado à soluções de 100 ppm de cloro.

A partir de concentrações de 150 ppm de cloro (pH 7,15±0,23), a proteína verde fluorescente exibiu comportamentos diferentes, evidenciado por duas curvas de decaimento distintas para um mesmo tratamento. Em 184 ppm, por exemplo, após os 30 segundos iniciais de contato, a GFP decaiu 82%, e fluorescência não foi detectada a partir de 5 minutos de contato (Figura 6.4.).

Tabela 6.3. Valores D obtidos das curvas de redução de fluorescência (\log_{10}) para exposição de GFP às soluções cloradas de tampão fosfato (pH 7,15±0,23) com agitação. A concentração inicial de GFP foi de 8,73±0,50 µg/mL.

Concentração nominal de cloro (ppm)	Concentração disponível de cloro (ppm)	Valor D (min)
200	183,9	1,0
150	147,1	1,3
125	110,4	55,6
100	93,6	83,3
90	84,0	83,3
80	73,5	166,7
75	55,1	185,2
70	36,8	208,3
60	55,2	277,8
50	51,8	555,6

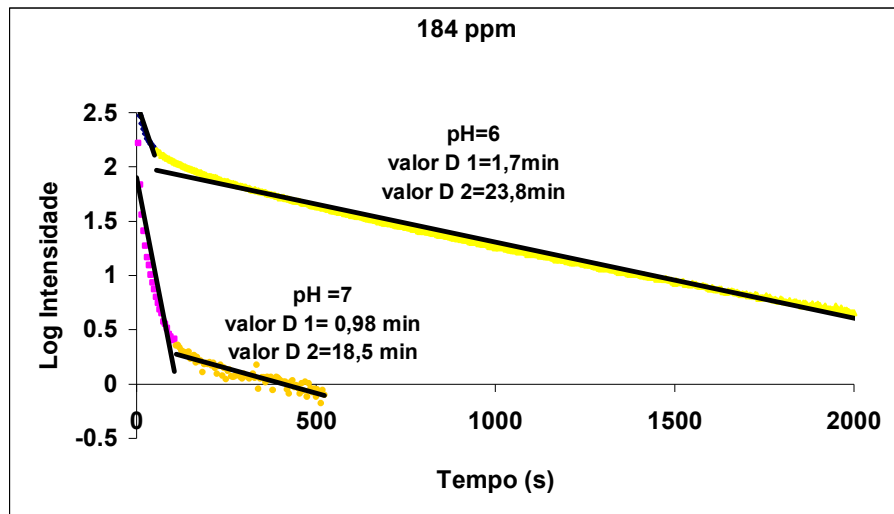


Figura 6.4. Comparação dos valores D para soluções cloradas com tampão fosfato (184 ppm de cloro livre) em pH 6 e 7.

6.4 CONCLUSÕES

Estudos preliminares demonstraram reduções de 2-3 ciclos logaritmos nas populações de *E. coli*, após 30 s em contato com soluções cloradas (50 – 100 ppm, pH 6,0) e *Listeria monocytogenes* foi inativada em conato com soluções de cloro 1 – 4 ppm em 30 segundos (EL-KEST E MARTH, 1998).

Exposição a soluções cloradas de 200 ppm causou decaimento de 0,3 - 0,4 ciclos logaritmo em contagem de células viáveis de microrganismos em folhas de alface após 5 minutos de contato (SON *et al.*, 2005) e concentrações de 100 – 200 ppm causaram redução de 5 ciclos logaritmos em cepas de *E. coli* após 30 segundos de contato (SILVA *et al*, 2003). Ao mesmo tempo, populações de *Salmonella* não sofreram redução considerável em contato com soluções de cloro 100 - 200 ppm (pH 6,8 ajustado com tampão fosfato) após 40 segundos de contato (WEISSINGER, 2000). LI e colaboradores (2001) relataram que 20 ppm de cloro em

solução (pH 7) não reduziu a população de *E. coli* O157:H7, após 90 segundos a 20 – 50 °C.

LUND e colaboradores (2005) avaliaram soluções cloradas (100 – 200 ppm) em diferentes condições de pH, reduzindo a população inicial de microrganismos em folhas de mandioca. Quando o pH foi ajustado para 6 o decaimento de células viáveis foi de 3 ciclos logaritmos em 15 minutos de contato. O valor de pH foi considerado o parâmetro mais importante no efeito das soluções cloradas.

Células de *Aureobasidium pullulans* expressando GFP foram expostas à soluções cloradas em concentrações variadas entre 25 – 150 ppm com diferentes valores de pH, e observou-se que a intensidade de fluorescência e a morte celular foram dependentes da concentração. Hipoclorito de sódio com 75 ppm de cloro livre causou redução da viabilidade de microrganismos em 2 ciclos logarítmicos e a intensidade de fluorescência foi reduzida em 38% nos primeiros 30 segundos de contato, chegando a redução de 4 ciclos logarítmicos e 89% na intensidade de fluorescência após 10 minutos de exposição. A intensidade de fluorescência emitida pela GFP foi quase completamente recuperada quando as células foram ressuspendidas em tampão pH 7, a viabilidade celular não foi alterada, demonstrando que a GFP apresenta grande estabilidade no citosol (WEBB *et al.*, 2001).

A correlação entre perda de fluorescência e redução de viabilidade celular foi observada (CASEY E NGUYEN, 1995, WEBB *et al.*, 2001) anteriormente, no entanto este é o primeiro esforço em demonstrar que a proteína verde fluorescente pode ser empregada como biossensor em tempo real para validação da eficácia antimicrobiana.

Comportamentos similares foram observados para as células vegetativas de *E. coli*, *A. calcoaceticus*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *S. marcescens* e as cepas esporuladas de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, em concentração inicial de 10^6 UFC/mL foram reduzidas 2 ciclos logarítmicos após os 30 segundos de contato inicial com solução clorada de 250 ppm, em pH 7. Densidade celular menor promoveu maior redução de fluorescência (38%) após os 30 segundos iniciais (MAZZOLA *et al.*, 2003).

Neste trabalho, a intensidade de fluorescência de GFP foi reduzida em 42% nos primeiros 30 segundos de contato com solução de 70 ppm de cloro em solução tampão. O valor D da GFP à 70 -80 ppm de cloro (pH $7,15 \pm 0,23$, em tampão fosfato) foi em torno de 3h.

A estabilidade da GFP foi maior em valores de pH entre 6 - 7 (PENNA *et al.*, 2005), semelhante a estabilidade das bactérias na mesma faixa de pH. Estudos anteriores reafirmaram que a perda da fluorescência e da viabilidade celular foram dependentes do valor de pH 7 (PENNA *et al.*, 2005).

Neste estudo foram verificados (i) a influência do hipoclorito de sódio na intensidade de fluorescência da GFP; e (ii) o intervalo mínimo de tempo necessário para reduzir em 90% a intensidade inicial de fluorescência. Estes resultados encorajam outros estudos validando a estabilidade da fluorescência da GFP em diferentes soluções antimicrobianas como bioindicador.

CAPÍTULO VII

EXTRAÇÃO DO COMPLEXO PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE E CBM-9 DO HOMOGENEIZADO CELULAR DE *Escherichia coli* UTILIZANDO SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS

7.1 INTRODUÇÃO

Validação da eficácia dos processos de descontaminação e desinfecção utilizados em ambiente industrial e hospitalar é uma tarefa ao mesmo tempo importante e desafiadora. Indicador biológico (IB) é uma molécula que possibilita a detecção de atividade biológica, permitindo a validação de processos de descontaminação e desinfecção (MAZZOLA *et al.*, 2003; PENNA *et al.*, 2001; PENNA *et al.*, 2004a, b). IBs podem ser suspensões de microrganismos específicos com resistência definida a determinado processo de descontaminação (ISO 11134, ISO 14937). Enzimas e proteínas também têm sido utilizadas como IBs para avaliação imediata da eficácia de processos industriais, tais como branqueamento, pasteurização, desinfecção e também para monitorar a conservação de um produto submetido previamente à desinfecção ou esterilização (EAGERMAN E ROUSE, 1976; FORSYTH *et al.*, 1999; PIYASENA *et al.*, 1998; TIJSKENS *et al.*, 1999; PENNA *et al.*, 2004; VILLAMIEL *et al.*, 1997).

A proteína verde fluorescente (GFP) pode ser empregada como indicador biológico devido à facilidade de sua detecção por espectrofluorimetria ou por inspeção visual utilizando lâmpada UV portátil (PENNA *et al.*, 2004). A proteína GFP demonstrou em trabalhos anteriores resistência à exposição a agentes químicos e a temperaturas elevadas (PENNA *et al.*, 2004). A resistência da GFP possibilita sua

utilização como indicador biológico, pois, após determinado tratamento, a ausência ou diminuição da intensidade de fluorescência emitida indica que microrganismos presentes também foram afetados.

A proteína verde fluorescente recombinante, GFPuv, pode ser expressa com facilidade por bactérias, como *Escherichia coli*, podendo ser produzida em maior quantidade por processos fermentativos. No entanto, para se utilizar GFP como indicador biológico é necessário que seja desenvolvido um método de purificação simples, com boa relação custo-benefício e que possa ser utilizado em maior escala. Atualmente, a proteína GFP é purificada em escala laboratorial por partição em três fases ou em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (DENNISON E LOVRIEN, 1997; PENNA *et al.*, 2004a, b).

Extração líquido-líquido é um método alternativo de purificação que tem sido estudado em vários tipos de sistemas complexos que atendem de forma interessante as necessidades de biosseparação em casos diversos (ALBERTSSON, 1956; BORDIER, 1981; JOHANSSON *et al.*, 1996, 1999; KAMEI *et al.*, 2002a, 2002b; NIKAS *et al.*, 1992; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003; SIVARS E TJERNELD, 2000; SIVARS *et al.*, 2000). Em particular, sistemas micelares de duas fases aquosas, que são formados quando uma determinada classe de tensoativo é dissolvida em água, são considerados promissores para separação de biomoléculas (NIKAS *et al.*, 1992). Nestes sistemas, a separação de fases pode ser induzida por alterações mínimas no sistema (por exemplo, aumento de temperatura). As duas fases micelares coexistentes formadas (uma rica e outra pobre em micelas) são predominantemente aquosas, garantindo ambiente ameno para as biomoléculas e proteínas. As micelas presentes na fase rica em micelas são, em geral, maiores e abundantes se comparadas à fase pobre em micelas. A diferença resulta em dois

ambientes físico-quimicamente distintos que coexistem e que possibilitam o processo de separação. Historicamente, sistemas micelares de duas fases aquosas foram empregados para separação de proteínas e biomoléculas baseado na hidrofobicidade (BORDIER, 1981), tamanho (NIKAS *et al.*, 1992) e carga (KAMEI *et al.*, 2002a, 2002b).

Um avanço recente na utilização de sistemas micelares de duas fases aquosas é a incorporação de ligantes de afinidade que aumentam o rendimento e a especificidade do processo de extração (LAM *et al.*, 2004; SAITOH E HINZE, 1995). O fundamento por trás desse conceito é que o comportamento durante a partição de biomoléculas hidrofílicas é baseado na exclusão pelo volume (LIU *et al.*, 1996; NIKAS *et al.*, 1992). Conseqüentemente tais moléculas, na ausência de outras formas de interação, são particionadas para a fase pobre em micelas, onde há maior volume de água livre. Uma separação mais eficiente pode ser alcançada se forem empregadas estratégias que induzam a biomolécula alvo a particionar preferencialmente para a fase rica em micelas, explorando interações baseadas em afinidade, especialmente quando a proteína-alvo encontra-se inicialmente no homogeneizado celular do microrganismo que a expressa (LAM *et al.*, 2004).

A idéia inicial deste conceito foi descrita recentemente por LAM *et al.*, (2004), que demonstrou que interações por afinidade aumentaram a partição da molécula-alvo para a fase rica em micelas. A fusão do nitrogênio terminal da proteína GFP com o grupo CBM9 (9 *carbohydrate binding module*) da xilanase 10A da *Thermotoga maritima* resultou no complexo CBM9-GFP, que foi clonado e expresso pelas células de *E. coli* BL21 (KAVOOSI *et al.*, 2004). O domínio CBM9 se liga fortemente à celulose e também a outros mono- e oligossacarídeos com menor intensidade. Quando esta proteína foi particionada em sistema micelar de duas fases aquosas

formado pelo tensoativo não-iônico n-decil β -D-glicopiranosidase ($C_{10}G_1$), ela foi extraída preferencialmente para a fase rica em micelas devido à interação entre o domínio CBM9 e as cabeças de glicose do tensoativo (LAM *et al.*, 2004).

Há inúmeras vantagens na fusão de uma proteína específica com um grupo que apresente afinidade por um determinado sistema. Especificamente, o tensoativo $C_{10}G_1$ está disponível comercialmente e já foi estudado (BALZER E LÜDERS, 2000). Dentre suas principais características está o ambiente ameno proporcionado para biomoléculas e proteínas, não causando denaturação. Outro quesito importante na escolha de um tensoativo adequado para um determinado sistema é a sua habilidade em formar duas fases em uma faixa conveniente de temperatura, que não cause injúrias para a molécula-alvo. Neste sistema específico o tensoativo $C_{10}G_1$ atua simultaneamente como o ligante de afinidade e como responsável pela formação de duas fases coexistentes, simplificando o procedimento experimental e o modelamento teórico. A afinidade do domínio CBM9 por monossacarídeos, tal como glicose, facilita a separação da proteína do ligante de afinidade após a extração para que a proteína seja recuperada isoladamente e para que o tensoativo seja reutilizado. Esse passo pode ser alcançado adicionando-se glicose, um reagente seguro e barato, como inibidor competitivo para a proteína (LAM *et al.*, 2004).

Neste manuscrito, foi reportada extração preferencial da proteína fundida CBM9-GFP (proteína-alvo) de um lisado celular clarificado de *E. coli*, com remoção simultânea de proteínas e outras substâncias remanescentes da célula. Foi demonstrado que partição de proteínas por sistemas micelares de duas fases aquosas baseada em afinidade pode ser aplicada diretamente a um lisado celular para a purificação de GFP, estabelecendo um método que pode ter sua escala

ampliada, oferecendo assim grande vantagem na purificação de proteínas recombinantes utilizando CBM9 como ligante de afinidade.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material

O tensoativo não-iônico C₁₀G₁ (n-decil β-D-glicopiranosidase – lote número 012K5028), e todos os outros reagentes utilizados nos ensaios de partição foram comprados da Sigma[®] (St. Louis, MO). Todos os reagentes apresentaram grau analítico e foram utilizados como recebidos. Todas as soluções foram preparadas em pH 7,2 utilizando 16,4 mM de fosfato dissódico e 1,82mM de ácido cítrico (tampão McIlvaine) em água purificada através de um sistema de troca-iônica Millipore Milli-Q (Bedford, MA). O *kit* de determinação de proteínas totais utilizado foi *BCA Protein Assay Kit* comprado da Pierce (Rockford, IL). A vidraria utilizada em todos os ensaios foi lavada em banho de 50:50 de etanol : 1M de hidróxido de sódio, seguida por banho de ácido nítrico 1M, enxaguada com água Milli-Q em abundância, e secas em estufa à 90 °C.

Produção da Proteína e Preparação do Homogeneizado Celular Clarificado

A clonagem da fusão CBM9-GFP e a produção da proteína foram descritas detalhadamente por KAVOOSI *et al.*, (2004). Resumidamente, culturas de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET28-GFP ou pET28-CBM9-GFP foram cultivadas *overnight* e diluídas 100 vezes em meio de extrato de levedura, triptona e fosfato (TYP) suplementado com 50μg/mL de canamicina. As cultura celular foi mantida à

37°C até atingir densidade óptica (DO) à 600 nm de 1,0, e a produção protéica foi induzida pela adição de isopropil-1-tio- β -D-galactose (IPTG) 0,3mM. A cultura foi mantida à 30°C por um período de 10-12h. As células foram removidas por centrifugação (8500g/20 min/4°C) e ressuspensas em tampão de cloreto de sódio 1M e fosfato de potássio 50mM, pH 7,0 e rompidas por duas passagens consecutivas em prensa francesa (pressão de 21.000 lb in⁻²). Os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação (27.000g/30 min/4°C), resultando em lisado celular clarificado que foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Determinação da Concentração de CBM9-GFP por Fluorimetria

A determinação das concentrações de CBM9-GFP em soluções aquosas de tensoativo foi determinada por fluorimetria em um espectrofluorímetro QuantaMaster (Photon Technology Int., Inc., NJ). O comprimento de onda de excitação foi de 395nm e o comprimento de onda de emissão foi de 508nm. CBM9-GFP pura, preparada como descrito por KAVOOSI e colaboradores (2004), foi utilizada para determinação de curvas de calibração. Especificamente, soluções de concentrações conhecidas de CBM9-GFP e de tensoativo (semelhantes às aquelas encontradas nas fases rica e pobre em micelas) foram analisadas por fluorimetria, e curva de calibração utilizando valores de fluorescência e concentração de CBM9-GFP foi construída. As curvas de calibração apresentaram comportamento linear, e a exatidão dos ensaios foi confirmada pelas medidas das concentrações de proteínas em ambas as fases do sistema micelar e pelo balanço de massa total do sistema.

Determinação da Concentração Total de Proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método BCA (*bicinchoninic acid*) (BCA) (SMITH *et al.*, 1985). Este método é baseado na reação entre as ligações peptídicas na região de quatro aminoácidos em particular (cisteína, cistina, triptofano e tirosina) com moléculas de cobre Cu^{2+} , formando Cu^+ , que gera um complexo roxo na presença de BCA. Este complexo é solúvel em água e absorve fortemente em 562nm. Os ensaios foram conduzidos seguindo o guia do fabricante. A curva de calibração foi determinada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A fase rica em micelas não pôde ser analisada por este método pois a concentração de tensoativo é elevada (10%) e extrapola a concentração permitida pelo ensaio (até 5%). Portanto, a concentração total de proteínas na fase rica em micelas foi calculada pela subtração da concentração total de proteínas na fase pobre em micelas do total de proteínas do homogeneizado celular.

Determinação do Diagrama de Fases do Tensoativo C_{10}G_1 através do Método do Ponto de Névoa

O diagrama de fases do tensoativo C_{10}G_1 na presença de homogeneizado celular clarificado foi determinada pelo método do ponto de névoa (BRIGANTI *et al.*, 1991; NIKAS *et al.*, 1992). Três concentrações distintas de homogeneizado celular (diluído 5x, 10x e 40x) foram adicionadas a soluções de tensoativo em concentrações conhecidas (5%) e colocadas em banho de água com controle de temperatura ($\pm 0,02$ °C). Agitador magnético foi utilizado para garantir que o sistema fosse mantido homogêneo quanto à temperatura e à concentração. Inicialmente a temperatura foi reduzida para que o sistema exibisse uma fase única homogênea. Em seguida a temperatura foi lentamente aumentada até que a solução ficasse turva (ponto de névoa) indicando separação de fases. O procedimento foi repetido 3 vezes

para garantir reprodutibilidade. A concentração de $C_{10}G_1$ em cada uma das fases coexistentes, em determinada temperatura, pode ser lida através do diagrama de fases (Figura 7.1).

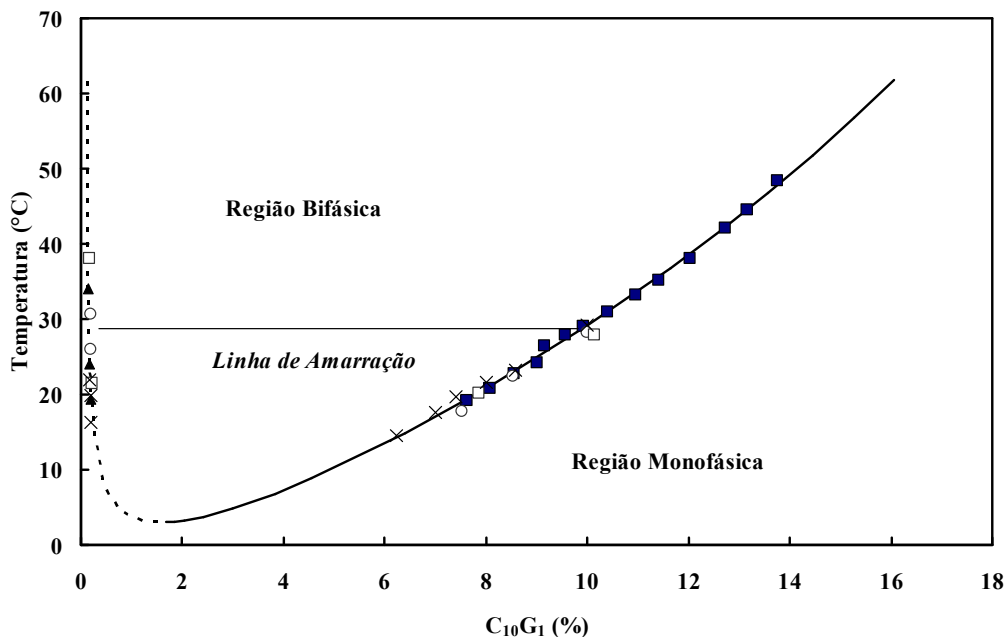


Figura 7.1. Diagrama de fases para o sistema $C_{10}G_1$ /tampão na presença e ausência de homogêneo celular. Os quadrados (■) e triângulos (▲) cheios representam pontos de névoa determinado experimentalmente para a fase rica e pobre em micelas, respectivamente. Os círculos (○), quadrados (□) e cruzeiros (x) representam pontos de névoa determinados experimentalmente para o sistema $C_{10}G_1$ /tampão na presença de homogêneo celular diluído 5x, 10x e 40x, respectivamente. O erro experimental para os pontos de névoa é de $0,1^{\circ}C$ (contidos nos símbolos devido a escala). A linha cheia (—) e linha pontilhada (---) representam a melhor curva contendo os pontos determinados experimentalmente na ausência de lisado celular (LAM *et al.*, 2004). A região de duas fases coexistentes, de uma fase homogênea e a linha de amarração ($29^{\circ}C$) estão indicadas.

Partição da CBM9-GFP no Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

Soluções tamponadas, de volume final 3mL, foram preparadas em tubos de ensaio graduados. A concentração final de tensoativo foi de $0,05g C_{10}G_1/g$ total (5%) e a ela foi adicionado o homogêneo celular diluído. As soluções resultantes foram homogêneas e colocadas em um banho termorregulado à $29^{\circ}C$. A relação

entre os volumes das fases foi 1:1, que também confirma a precisão da curva de coexistência ou diagrama de fases (ver Resultados e Discussão). As soluções foram mantidas nessas condições até atingir equilíbrio de partição entre as fases (6h).

Após equilíbrio de partição, as duas fases coexistentes foram amostradas separadamente com auxílio de seringas e agulhas descartáveis. A concentração de CBM9-GFP e de proteínas totais foram determinadas como descrito anteriormente no item 7.2. Cada ensaio de partição foi repetido 3 vezes.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes dos ensaios de partição, a concentração de CBM9-GFP e a concentração de proteínas totais do homogeneizado celular foi determinada por fluorimetria e pelo kit BCA, respectivamente. A concentração de CBM9-GFP foi de $1,81 \pm 0,03$ mg CBM9-GFP/g total (em que g total é a massa final do sistema preparado) e a concentração de proteínas totais foi de $25,7 \pm 0,4$ mg de proteína/g total. Devido a alta viscosidade e turbidez o lisado celular puro não foi estudado pela impossibilidade de se determinar um ponto de névoa descrito em Material e Métodos. Especificamente, não foi possível determinar o ponto de névoa com precisão, pois a transição límpido/turvo sofreu interferência da turbidez do lisado celular. Após partição do lisado celular puro não foi possível amostrar cada uma das fases por causa da viscosidade. Por estes motivos os ensaios foram realizados com homogeneizado celular diluído. Para avaliar a interferência dos níveis de diluição do lisado celular no comportamento do diagrama de fases e na partição do CBM9-GFP, três níveis de diluição (5x, 10x e 40x) foram investigados.

O comportamento do diagrama de fases dos sistemas micelares é muito sensível à presença de impurezas (BALZER E LÜDERS, 2000), e por este motivo se

fez necessária a investigação da influência da adição de um componente complexo nas soluções de C₁₀G₁. O diagrama de fases do tensoativo puro e aquele mapeado na presença de lisado celular nas três concentrações escolhidas é apresentado pela Figura 7.1. A curva de coexistência experimental, assim como os dados gerados pelo modelo teórico, na ausência de homogeneizado celular (determinado por LAM *et al.*, 2004) também estão representados para fins de comparação. Como é possível observar a posição da curva de coexistência em presença e ausência de lisado celular (nas três concentrações consideradas) não são distinguíveis. Tal resultado apesar de inesperado pode ser confirmado pela razão de volume das fases, que pode ser previsto com precisão pela linha de amarração traçada no gráfico (LAM *et al.*, 2004). Especificamente, para os três ensaios de partição considerados, a razão entre os volumes das fases foi de 1:1, como esperado à 29°C, para uma concentração de tensoativo de 5%.

O comportamento da partição da proteína alvo CBM9-GFP pode ser quantificado em termos de coeficiente de partição, definido por:

$$K_{CBM9-GFP} = \frac{[CBM9-GFP]_{\alpha}}{[CBM9-GFP]_{\beta}} \quad (1)$$

em que $[CBM9-GFP]_{\alpha}$ e $[CBM9-GFP]_{\beta}$ são as concentrações medidas de CBM9-GFP nas fases rica em micelas (α) e pobre em micelas (β), respectivamente. Para quantificar a eficácia do método de separação na remoção de impurezas é interessante definir o coeficiente de partição das proteínas totais que provém do lisado celular da célula hospedeira, K_{HSP} :

$$K_{HSP} = \frac{[P]_{\alpha} - [CBM9-GFP]_{\alpha}}{[P]_{\beta} - [CBM9-GFP]_{\beta}} \quad (2)$$

em que $[P]_{\alpha}$ e $[P]_{\beta}$ são as concentrações de proteínas totais nas fases rica e pobre em micelas, respectivamente. Os resultados dos ensaios de partição, $K_{CBM9-GFP}$ e K_{HSP} , estão apresentados nas Figuras 7.2 e 7.3, respectivamente.

Na Figura 7.2, os coeficientes de partição (determinados experimentalmente) correspondentes às três concentrações de homogeneizado celular estudadas estão representados e comparados com o valor do coeficiente de partição do conjugado CBM9-GFP puro (LAM *et al.*, 2004). Nas mesmas condições experimentais (29°C, 5% C₁₀G₁), os coeficientes de partição determinados para as três concentrações de homogeneizado celular são semelhantes estatisticamente ($K_{CBM9-GFP} \sim 3$). Valores de coeficiente de partição maiores que 1 demonstram a eficiência do conceito de partição modulada por afinidade entre a molécula alvo e o tensoativo, pois o par CBM9-GFP foi extraído preferencialmente para a fase superior, rica em micelas, contrariando as forças de volume de exclusão que representariam a maior influência na partição de biomoléculas que seriam excluídas para a fase pobre em micelas devido ao tamanho (LIU *et al.*, 1995; LUE E BLANKSCHTEIN, 1996; NIKAS *et al.*, 1992). Além disso, o resultado de coeficiente de partição ($K_{CBM9-GFP}$) similar observado nas diluições estudadas de lisado celular sugerem que os ligantes de afinidade disponíveis na superfície do tensoativo ainda não estejam saturados, e que seriam efetivos para utilização em sistemas com maior concentração da proteína alvo. O fato dos valores de coeficiente de partição obtidos para o homogeneizado celular serem comparáveis àqueles obtidos para o par CBM9-GFP puro é encorajador do ponto de vista prático, pois demonstra que a presença de homogeneizado celular não interfere com a extração da proteína alvo por afinidade. O valor do coeficiente de partição da proteína CBM9-GFP é independente da presença de impurezas de modo que o modelo teórico desenvolvido para descrever

a partição de proteínas puras em sistemas micelares de duas fases aquosas por afinidade (LAM *et al.*, 2004) pode ser aplicado e validado para uma mistura complexa.

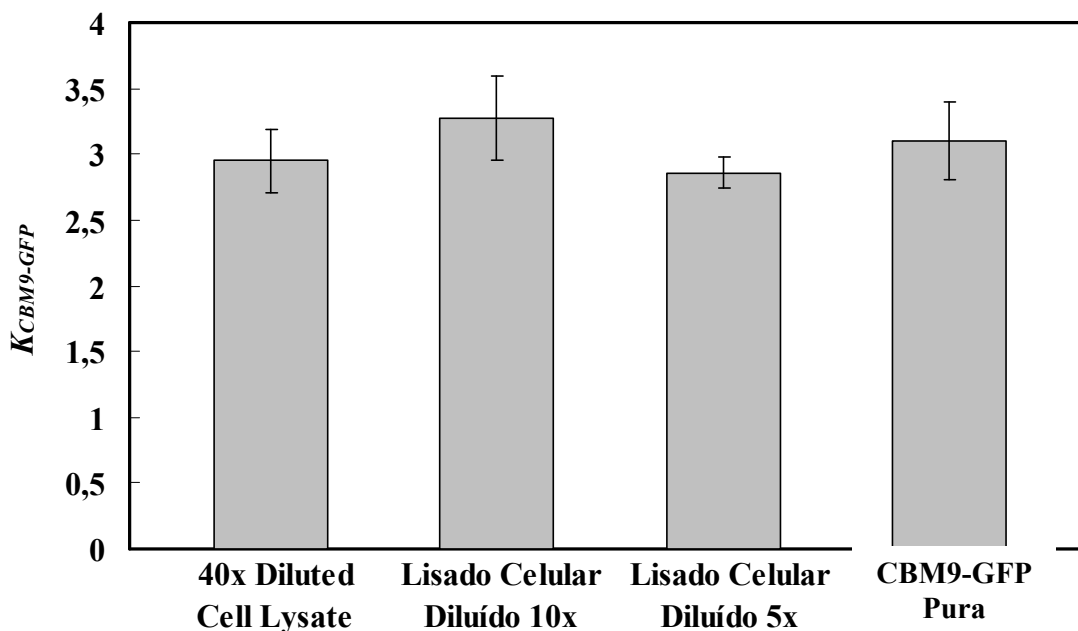


Figura 7.2. Coeficientes de partição da proteína alvo CBM9-GFP ($K_{CBM9-GFP}$) determinados experimentalmente em três níveis distintos de diluição (40x, 10x e 5x). O valor de $K_{CBM9-GFP}$ corresponde a partição da proteína pura (LAM *et al.*, 2004), nas mesmas condições experimentais (29°C, 5% C₁₀G₁). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para as medidas.

Os coeficientes de partição das proteínas provenientes da célula hospedeira, K_{HSP} , estão representados na Figura 7.3. Ao contrário do que se observa no caso de coeficientes de partição da proteína alvo (Figura 7.2), há maior variação nos valores de K_{HSP} nas diferentes concentrações de lisado celular, K_{HSP} no homogeneizado celular diluído 40x apresentou menor valor ($0,49 \pm 0,15$), seguido de K_{HSP} no homogeneizado celular diluído 10x apresentou valor ($0,65 \pm 0,06$), e K_{HSP} no homogeneizado celular diluído 5x apresentou valor ($0,99 \pm 0,09$). A princípio esperava-se que a partição de componentes hidrofílicos da célula hospedeira fosse preferencialmente para a fase pobre em micelas devido as interações relacionadas

ao volume de exclusão entre as proteínas e as micelas, resultando em coeficiente de partição menor que 1. Considerando que uma quantidade grande de componentes hidrofóbicos foi removida com os fragmentos celulares maiores na centrifugação, a maioria das proteínas remanescentes da célula hospedeira deveria apresentar caráter hidrofílico. No entanto, baseado em conceitos de volume de exclusão, pode-se esperar que o coeficiente de partição, K_{HSP} , fosse menor que 1, o que realmente acontece para os casos de homogeneizado celular diluídos 10 e 40x (Figura 7.3). Do ponto de vista prático, pode-se concluir que o método de separação foi capaz de remover a proteína alvo para a fase rica em micelas ($K_{CBM9-GFP} > 1$) e ao mesmo tempo removeu a maioria das proteínas provenientes da célula hospedeira para a fase pobre em micelas ($K_{HSP} < 1$). Devido à complexidade do lisado celular, e da impossibilidade de se utilizar o método de BCA para determinar a concentração individual de proteínas provenientes da célula hospedeira não foi possível se determinar rigorosamente a variação no K_{HSP} nas três concentrações de lisado celular estudadas.

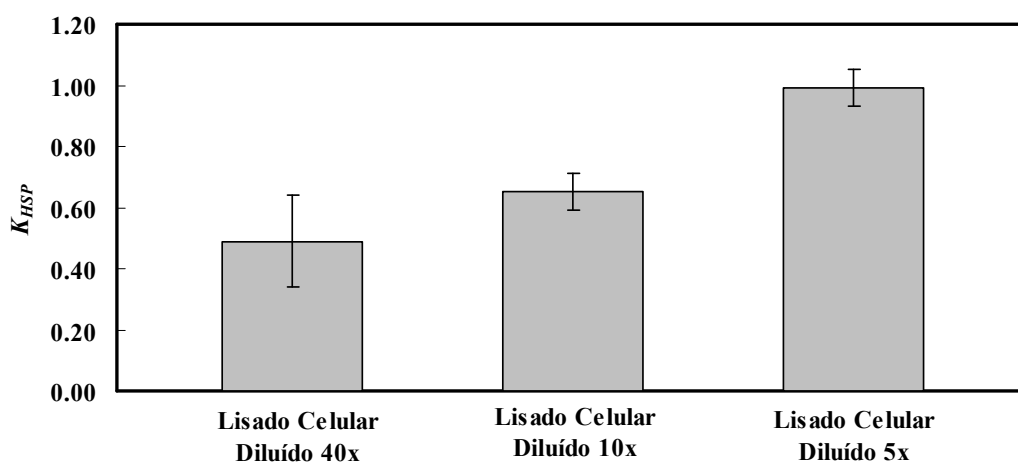


Figura 7.3. Coeficientes de partição das proteínas provenientes do lisado celular (K_{HSP}) determinados experimentalmente em três níveis distintos de diluição (40x, 10x e 5x), nas mesmas condições experimentais (29°C, 5% C₁₀G₁). As barras de erro representam 95% de intervalo de confiança para as medidas.

7.4 CONCLUSÕES

Nesse artigo, extração de biomolécula alvo, diretamente do lisado celular, foi demonstrada através de ligantes de afinidade. A separação efetiva da molécula alvo CBM9-GFP do homogeneizado celular foi obtida empregando sistema micelar de duas fases aquosas formado apenas por um tensoativo, C₁₀G₁, que desempenhou dois papéis importantes de tensoativo formador das duas fases coexistentes e como ligante de afinidade.

Para avaliar o efeito dos níveis de diluição do lisado celular no diagrama de fases e na partição da proteína-alvo, três diluições de homogeneizado celular foram investigadas (5x, 10x e 40x). O coeficiente de partição da proteína alvo ($K_{CBM9-GFP}$) foi independente da concentração de lisado celular e estatisticamente semelhante ao valor obtido para a proteína pura CBM9-GFP (LAM *et al.*, 2004). Estes resultados demonstram que a presença de componentes da célula hospedeira não interferiram com a partição da proteína-alvo, e que o sistema seria efetivo para utilização em ensaios com maiores concentrações de proteína, indicando assim que aumento de escala é viável. As proteínas provenientes da célula hospedeira particionaram preferencialmente para a fase pobre em micelas, onde há maior volume livre e menos interações estéricas ou de volume. É importante destacar que a maior variação nos valores de coeficiente de partição de proteínas provenientes da célula alvo foram observadas em concentrações maiores de lisado celular.

Em conclusão, a extração de partição de proteínas por afinidade diretamente do homogeneizado celular em sistema micelar de duas fases aquosas representa o primeiro esforço para o desenvolvimento de um processo de boa relação custo-benefício na separação e purificação da proteína GFP, e por conseguinte este

conceito poderá ser empregado na extração de outras proteínas ou biomoléculas de interesse.

CONCLUSÕES

Desinfetantes líquidos são empregados no mundo todo devido ao seu custo-benefício. Em ambiente hospitalar o agente escolhido deve ser de fácil manuseio e sem efeitos tóxicos. O mal uso de soluções desinfetantes pode desenvolver resistência dos microrganismos patogênicos. Faz-se necessário reforçar que mesmo os melhores programas de limpeza, desinfecção e esterilização podem promover infecções, caso não sejam realizados com eficiência, evidenciando a importância de treinamentos e a implantação de medidas de controle e avaliação periódicas. Um processo de desinfecção eficaz depende da seleção correta de agentes químicos em associação com um procedimento adequado de aplicação.

Água utilizada em centros de saúde e indústrias farmacêuticas deve ser analisada periodicamente como medida preventiva contra a contaminação por microrganismos, facilitando assim melhorias no sistema de tratamento e purificação. Análise de água para bactérias heterotróficas, como *Pseudomonas*, é importante para a prevenção da formação de biofilme e redução da concentração de pirogênio.

A correlação entre perda de fluorescência e redução de viabilidade celular observada encoraja a utilização da proteína verde fluorescente como bioindicador em tempo real para validação da eficácia anti-microbiana.

Para possibilitar a utilização desta proteína como indicador biológico é fundamental que os processos de produção, extração e purificação tenham seus custos reduzidos. Para tal a extração de biomolécula-alvo, diretamente do lisado celular, foi demonstrada através de sistema micelar de duas fases aquosas formado apenas por um tensoativo.

Estes resultados demonstram que a presença de componentes da célula hospedeira não interferiram com a partição da proteína-alvo, e que o sistema seria

efetivo para utilização em ensaios com maiores concentrações de proteína, indicando assim que aumento de escala é viável.

A extração de partição de proteínas por afinidade diretamente do homogeneizado celular em sistema micelar de duas fases aquosas representa o primeiro esforço para o desenvolvimento de um processo de boa relação custo-benefício na separação e purificação da proteína GFP.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON PÅ. Chromatography and partition of cells and cell fragments. **Nature**, v. 177, p. 771-774, 1956.
- ALFA, M. J., DEGAGNE, P., OLSON, N., PUCHALSKI, T. Comparison of Ion Plasma, Vaporized Hydrogen Peroxide, and 100% Ethylene Oxide Sterilizers to the 12/88 Ethylene Oxide Gas Sterilizer. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 17, p. 92-100, 1996.
- ASENJO, J. A. Separation processes in biotechnology. New York: Marcell Dekker, 1990. 287p.
- BACCAN, N., ANDRADE, J. C., GODINHO, O. E. S., BARONE, J. S. Química Analítica Quantitativa Elementar. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 308p.
- BALZER D., LÜDERS H. Nonionic surfactants: Alkyl polyglucosides. New York: Marcel Dekker. 2000. 560p.
- BLANKSCHTEIN, D., THURSTON, G. M., BENEDEK, G. B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **J. Chem. Phys.** v. 85, p. 7268-7288, 1986.
- BLOCK, S. S. Disinfection, sterilization, and preservation. 4ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 167–181. 1504p.
- BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **J. Biol. Chem.**, v.256, p. 1604-1607, 1981.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Altera o texto do subitem 3 do item IV da Portaria 15 de 23 de agosto de 1988, que passa a ter a seguinte redação: " desinfetantes para indústrias em superfícies onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, podendo utilizar, exclusivamente, os princípios ativos dos grupos C, D, E, F e H do SUBANEXO 1 e também a substância PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO". Resolução nº 211, de 18 de junho de 1999.

¹ De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1994.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Resolução nº 12 de 1978.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Indeferir o Pedido de Revalidação de Registro de Produto, de produtos farmacêuticos, conforme relação em anexo. Resolução RE nº 1469, de 13 de setembro de 2001.
- BRIGANTI, G., PUVVADA, S., BLANKSCHTEIN, D. Effect of urea on micellar properties of aqueous-solutions of nonionic surfactants. **J. Phys. Chem.**, v. 95, p. 8989– 8995, 1991.
- BURNETT, S. L., BEUCHAT, L. R., Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* O157:H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 74, p. 37-45, 2002.
- CASEY, W. M., NGUYEN, N. T. Use of the green fluorescent protein to rapidly assess viability of *Escherichia coli* in preserved solutions. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, v. 50, p. 352–355, 1995.
- CHALFIE, M., KAIN, S. Green Fluorescent Protein, Properties, Applications and Protocols. New York: Wiley, 1998. 400p.
- CHANGSEN, C., FRANZBLAU, S. G., PALITTAPONGARNPIM, P. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. **Antimicrob. Agents CH**, v. 47, p. 3682–3687, 2003.
- CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **Int. Biodeter. Biodegr.**, v. 51, p. 271 – 276, 2003.

- CHEVALIER, Y., ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. **Rep. Prog. Phys.** v. 53, p. 279-371, 1990.
- CONRAD, R. N. Increasing in hand-alcohol consumption among medical staff in a general hospital as a result of introducing a training program and a visualization test. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 22, p. 41-42, 2001.
- CRAMERI, A., WHITEHORN, E. A., TATE E. & STEMMER, W. P. C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nature Biotechnol.**, 14:315-319. 1996.
- CROSHAW, B. Disinfectant Testing – with Particular Reference to the Rideal-Walker and Kelsey-Sykes Tests. In Disinfectants. Their use and evaluation of effectiveness. New York: Academic Press, p. 1-14, 1981.
- DENNISON, C., LOVRIEN, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. **Protein. Express. Purif.**, v. 11, p. 149–161, 1997.
- DENTON, G. W. Chlorhexidine. In: Disinfection, sterilization, and preservation. (Edited by S.S. Block, 4th ed) Philadelphia: Lea & Feabiger 1991
- DIAS, F. N., GODOI, I. P., PENNA, T. C. V. Validação de sistema de purificação de água utilizada na lavagem de artigos médico-hospitalares. **Braz. J. of Pharm. Sci.** v. 40, p. 174-176, 2004.
- DIAZ, R.B., VESSONI PENNA, T.C., TAKEUTI, C.E., TAIRA, E.T., GUIMARÃES, T. Centralização do processo de desinfecção de materiais semi-críticos e não-críticos no Hospital Santa Cruz: melhoria da qualidade e redução de custos. **Laes & Haes**, v. 6, p. 68-78, 2000.
- EAGERMAN, B. A., ROUSE, A. H. Heat inactivation temperature- time relationships for pectinesterase inactivation in citrus juices. **J. Food Sci.**, v.41, p. 1396–1397, 1976.
- EL-KEST, S. E., MARTH, E. H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and its inactivation by chlorine. **J. Food Protec.**, v. 51, p. 530-539, 1988.
- ERKMEN, O. Hypochlorite inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in phosphate buffer. **Microbiol. Res.**, v. 159, p. 167-171, 2004.

- FÁGÁIN, C. O. Understanding and increasing protein stability. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1252, p. 1-14, 1995.
- FORSYTH, J. L., APENTEN, R. K. O., ROBINSON, D. S. The thermostability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* VAR. gemmifera. **Food Chem.**, v. 65, p. 99-109, 1999.
- FROTA, C. C., MOREIRA, J. L. B. Frequency of non-fermentative gram-negative bacilli isolated from clinical materials of patients at the Universidade Federal do Ceará Hospital Complex-Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 29, p. 179-182, 1998.
- GANDHI, P. A., SAWANT, A. D., WILSON, L., A., AHEARN, D. G. Adaptation and growth of *Serratia marcescens* in contact lens disinfectant solutions containing chlorhexidine gluconate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 183-188, 1993.
- GOEL, S., BOUWER, E. J. Factors influencing inactivation of *Klebsiella pneumoniae* by chlorine and chloramines. **Water Res.**, v. 38, p. 301-308, 2004.
- GRAHAM, G. S., BORIS, C. A. Chemical and Biological Indicators. In Sterilization technology, a practical guide for manufacturers and users of health care products. New York: Van Nostrand Reinhold; 1993, 36-70.
- INOUE, S. & TSUJI, F. I. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. **FEBS Letters** 341:277-280, 1994a
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO 11134**: Sterilization of Health Care Products – Requirements for Validation and Routine Control – Industrial Moist Heat Sterilization, 1994.
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **ISO 14937** Sterilization of Health Care Products – General Requirements for Characterization of a Sterilizing Agent and the Development, Validation and Routine Control of a Sterilization Process for Medical Devices, 2000.
- ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces. 2.ed. Academic, London and San Diego. 1991.

- JACOBS, P. T., WANG, J. H., GORHAM, R. A., ROBERTS, C.G. Disinfection, Sterilization and Antiseptics in Health Care. Champlain. New York: Polyscience Publishers, 165-166, 1998.
- JOHANSSON, H. O., LUNDH, G., KARLSTROM, G., TJERNELD, F. Effect of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1290, p. 289-298, 1996.
- JOHANSSON, H. O., PERSSON, J., TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 66, 247-257, 1999.
- KAMEI, D. T., KING, J. A., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 80, p. 233-236, 2002b.
- KAMEI, D. T., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. **Langmuir**, v. 18, p. 3047-3057, 2002a.
- KAVOOSI, M., MEIJER, J., KWAN, E., CREAGH, A. L., KILBURN, D. G., HAYNES, C. A. Inexpensive one-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with the family 9 carbohydrate-binding module of xylanase 10A from *T. maritima*. **J. Chromatogr. B**, v. 807, p. 87-94, 2004.
- KENNETH, J. R. Sterilization, Pasteurization and Desinfection. In: Sherris Medical Microbiology: an Introduction to Infectious Diseases. New York: Appleton and Lange, 171-178, 1994.
- KESSLER, M., HUU, T. C., MARIOT, A., CHANLIAU, J. Hemodialysis associated complications due to sterilizing agents ethylene oxide and formaldehyde. **Contrib. Nephrol.**, v. 62, p. 13-23, 1988.
- KREMER, L., BAULARD, A., ESTAQUIER, J., POULAIN-GODEFROY. O., LOCHT, C. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. **Mol Microbiol.**, v. 17, p. 913-922, 1995.

- KULA, M.-R. Liquid-liquid extraction of biopolymers. In: Moo-Young, Murray ed. *Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Oxford: Pergamon Press, v.2., 1985. 632p.
- LAM, H., KAVOOSI, M., HAYNES, C. A., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Affinity-enhanced protein partitioning in decyl β -d-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 89, p. 381-392, 2004.
- LEE, C., SU, W. Nonionic surfactant-mediated affinity cloud-point extraction of vancomycin. **Sep. Sci. Technol.**, v. 34(16), p. 3267-3277, 1999.
- LEVIN, N. W., PARNELL, S. L., PRINCE, H. N., GOTCH, F., POLASCHEGG, H. D., LEVIN, R., ALTO, A., KAUFMAN, A. M. The use of heated citric acid for dialyser reprocessing. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 6, p. 1578-1585, 1995.
- LI, Y., BRACKETT, R. E., SHEWFELT, R. L., BEUCHAT, L. R. Changes in appearance and natural microflora on iceberg lettuce treated in warm, chlorinated water and then stored at refrigeration temperature. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 299-308, 2001.
- LIU, C. L., NIKAS, Y. J., BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 52, p. 185-192, 1996.
- LIU, C., KAMEI, D. T., KING, J. A., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **J. Chromatogr. B**, v. 711, p. 127-138, 1998.
- LUE, L., BLANKSCHTEIN, D. A liquid-state theory approach to modeling solute partitioning in phase-separated solutions. **Industr. Eng. Chem. Res.**, v. 35, p. 3032– 3043, 1996.
- LUND, D. G., PETRINI, L. A., ALEIXO, J. A. G., ROMBALDI, C. V. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Cienc. Rural.**, v. 35, p. 1431-1435, 2005.
- MACEDO, J. A. B. *Águas & Águas*. Belo Horizonte: Conselho Regional de Química, 2004.

- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. Illinois: Pearson Education Publishers, p. 696-707, 2002,.
- MAKINO, S., REYNOLDS, J. A., TANFORD, C. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. **J. Biol. Chem.** v. 248, p. 4926-4932, 1973.
- MARTINS, A. M. S., PENNA, T. C. V. Água purificada para a lavagem de produtos médico-hospitalares. **Revista Controle de Contaminação**, v. 20, 2000.
- MAZZOLA, P. G., PENNA, T. C. V., MARTINS, A. M. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. **BMC Infec. Dis.**, 3:24, 2003.
- MAZZOLA, P.G. Eficácia dos agentes físicos e químicos no programa de limpeza, desinfecção e esterilização. Saúde da população. Controle da Infecção Hospitalar. CNPq. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Prêmio Jovem Cientista**. v. 16, p. 139-181, 2000.
- MAZZOLA, P.G., VESSONI PENNA, T.C., MACHOSHVILI, I.A., ROGRIGUES, R. C. Eficácia dos Agentes Químicos no Programa de Limpeza, Desinfecção e Esterilização. **Laes & Haes**, v. 127, p. 100-126, 2000.
- McDONNELL, G., RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 147-179, 1999.
- MERRITT K, HITCHINS VM, BROWN SA. Safety and cleaning of medical materials and devices. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 53, p. 131-136, 2000.
- MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cad. Saúde Públ.**, v. 10, p. 99-110, 1994.
- MOZHAEV, V. V., MARTIEK, K. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). **Enz. Microbiol. Tech.**, v. 4, p. 299-309, 1982.
- NIKAS, Y. J., LIU, C. L., SRIVASTAVA, T., ABBOTT, N. L., BLANKSCHTEIN, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. **Macromolecules**, v. 25, p. 4794-4806, 1992.
- NOGAROTO, S. L., PENNA, T., C., V. Desinfecção e Esterilização. São Paulo. Ed. Atheneu, 1ª. Edição, 2006.

O ESTADO DE SÃO PAULO - Agência de Notícias, <http://estado.com.br/jornal>. Acessado em Janeiro de 2001.

SABESP ON LINE – www.sabesp.com.br. Acessado em Julho de 2003.

PENNA, T. C. V., ISHI, M., KUNIMURA, J., CHOLEWA, O. Stability of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) in glucose solutions at different concentrations and pH values. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121, p. 501-528, 2005.

PENNA, T. C. V., ISHII, M., PESSOA, Jr., A., CHOLEWA, O. Thermal stability of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) at various pH values. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 113, p. 469-483, 2004.

PENNA, T. C. V., MACHOSHVILI, I. A., TAQUEDA, M. E. S. *Bacillus stearothermophilus* sporulation response to different composition media. **PDA J. Pharm. Sci. Techn.**, v. 52, p. 198-208, 1998.

PENNA, T. C. V., MARTINS, A. M., MAZZOLA, P. G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. **J. BMC Public Health**, 2:13, 2002.

PENNA, T. C. V., MAZZOLA, P. G., MARTINS, A. M. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. **BMC Infec. Dis.**, 1:16, 2001.

PIYASENA, P., LIOU, S., MCKELLAR, R. C. Predictive modeling of inactivation of *Listeria* ssp. in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, p. 167-173, 1998.

QUINA, F. H., HINZE, W. L. Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. **Ind. Eng. Chem. Res.**, s.l., v.38, n.11, p.4150-4168, 1999.

RANGEL-YAGUI CO, LAM H, KAMEI DT, WANG DIC, PESSOA-JR A, BLANKSCHTEIN, D. Glucose6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 82, p. 445-456, 2003.

ROBART, F.D., WARD, W.W. Solvent perturbations of *Aequorea* green fluorescent protein. **Photochem.**, v.51, 92s., 1990.

- RUSSELL, A. D. Chemical sporicidal and sporostatic agents. In: Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 365–376, 1991.
- RUSSELL, A. D. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. **J. Appl. Microb.**, v. 92, p. 121-135, 2002.
- RUTALA, W. A. APIC guidelines for selection and use of disinfectants. **Am. J. Infect. Control**, v. 23, p. 313-342, 1995.
- RUTALA, W. A. APIC Guideline for selection and use of disinfectants. **AJIC Am. J. Infect. Control.**, v. 23, p. 35-65, 1995.
- RUTALA, W. A. Chemical Germicides in Health Care. Polyscience Publications, Quebec, Canada. 1995. 312 pages.
- RUTALA, W. A. Disinfection, Sterilization and Antiseptics in Health Care. New York: Polyscience Publishers, 1998. 292 p.
- RUTALA, W. A. Selection and use of disinfections in health care. In: Hospital epidemiology and Infection Control. Philadelphia: Mayhall, 1996.
- RUTALA, W. A., WEBER, D. J. FDA labeling requirements for disinfection of endoscopes: a counterpoint. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.16, p. 231-235, 1995.
- RUTALA, W. A., WEBER, D. J. Principles of disinfecting patient-care items. In: Disinfection, Sterilization and Antiseptics in Health Care. New York: Polyscience Publishers, 133-149, 1998.
- RUTALA, W. A., WEBER, D. J. Registration of disinfectants based on relative microbicidal activity. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 25, p. 333-41, 2004.
- RUTALA, W. A., WEBER, D. J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 597-610, 1997.
- SAGRIPANTI, J. L., BONIFACINO, A. Effects of salt and serum on the sporicidal activity of liquid disinfectants. **J. AOAC Intern.**, v. 80, p. 1198-1207, 1997.
- SAITOH, T., HINZE, W. L. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. **Talanta**, v. 42, p. 119– 127, 1995.

- SÁNCHEZ-FERRER, A., BRU, R., GARCÍA-CARMONA, F. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, p. 275-313, 1994.
- SATTAR, S. A. Microbicidal testing of germicides: an update. In: Disinfection, Sterilization and Antiseptics in Health Care (Edited by Rutala WA) New York, Polyscience Publishers 1998227-240
- MOOLENAOR, R. L., CRUTCHER, M. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: Did staff fingernails play a role in disease transmission? *Inf. Control Hos. Epidemiol.* V. 21, p. 80-85, 2000.
- SCHRECKENBERGER, P. C., JANDA, J. M., WONG, J. D., BARON, E.J. Algorithms for identification of aerobic gram-negative bacteria. In: Manual of Clinical Microbiology. 7th edition. Edited by Murray PR. Washington: American Society For Microbiology, 1999, 438-452.
- SILVA, N., SILVEIRA, N. F. A., YOKOYA, F., OKAZAKI, M. M. Occurrence of *Escherichia coli* 0157:H7 in vegetables and its resistance to the disinfectants used in fresh produce. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 167-173, 2003.
- SIRIMANNE, S.R., PATTERSON-Jr, D.G., MA, L., JUSTICE Jr, J.B. Application of cloud-point extraction-reversed-phase high-performance liquid chromatography – A preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. **J. Chromatogr. B**, v. 716, p. 129-137, 1998.
- SIVARS, U., ABRAMSON, J., IWATA, S., TJERNELD, F. Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome b_0 ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer. **J. Chromatogr. B**, v. 743, p. 307-316, 2000
- SIVARS, U., TJERNELD, F. Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membranes proteins. **BBA-Gen Subjects**, v. 1474, p. 133-146, 2000.

- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J., KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, p 76-85, 1985.
- SON, H., CHO, M., KIM, J., OK, B. Enhanced disinfection efficiency of mechanically mixed oxidants with free chlorine. **Water Res.**, v. 39, 721-727, 2005.
- SPAULDING, E. H. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Disinfection sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 1968.
- SRIVASTAVA, R., DEB, D. K., SRIVASTAVA, K. K., LOCHT, C., SRIVASTAVA, B. S. Green fluorescent protein as a reporter in rapid screening of antituberculosis compounds in vitro and in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 253, p.431-436, 1998.
- TRAUMANN, M. M., MICHALSKY, T., WIEDECK, H., RADOSAVLJEVIC, V., RUHNKE, M. Tap Water Colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 22, p. 49-52, 2001.
- TRUJILLO R, LAIBLE N. Reversible inhibition of spore germination by alcohols. **Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 620-623, 1970.
- UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION; INC 12601 Validation and Qualification of Water purification, storage, and distribution systems. USP 24 NF 19 p 2155-2163.
- VESSONI PENNA, T. C. Esterilização térmica. Conceitos Básicos da Cinética de Morte Microbiana. Revista Farmácia Bioquímica, v. 1, p. 1-5, 1997.
- VESSONI PENNA, T. C., ISHII, M., CHOLEWA, O., SOUZA, L. C. Thermal characteristics of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) extracted from *Escherichia coli*. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 38, p. 135-139, 2004a.
- VESSONI PENNA, T. C., MACHOSHVILI, I. A., BASTON, L.M. Importância da autoclave em lactário hospitalar. **Laes & Haes**, v.16, p.68-74, 1994.

- VESSONI PENNA, T. C., SCHAFFNER, D., ABE, L. E., MACHOSHVILI, I. A. Inactivation of Brazilian wild type and enterotoxigenic *Escherichia coli* by chlorine. *J. Ind. Microbiol.*, v. 16, p. 57-61, 1996.
- VESSONI PENNA, T.C., ISHISAKI, E. T., FERRAZ, C. A. Esterilização de artigos médico-hospitalares por plasma de peróxido de hidrogênio. **Laes & Haes**, v. 6, p. 88-100, 1997.
- VILLAMIEL, M., LÓPEZ-FANDINO, R., CORZO, N., OLANO, A. Denaturation of b-lactoglobulin and native enzymes in the plate exchanger and holding tube section during continuous flow pasteurization of milk. **Food Chem.**, v. 58, p. 49–52, 1997.
- WARD W. W., CODY, C. W., HART, R. C. & CORMIER, M. J. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in Renilla and *Aequorea* green-fluorescent proteins. **Photochem. Photobiol.** 31:611-615. 1980.
- WARD, W. W. Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. **Methods Biochem. Anal.**, v. 47, p. 39-65, 2006.
- WEBB, J. S., BARRATT, S. R., SABEV, H., NIXON, M., EASTWOOD, I. M., GREENHALGH, M., HANDLEY, P. S., ROBSON, G. D. Green fluorescent protein as a novel indicator of antimicrobial susceptibility in *Aureobasidium pullulans*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 67, p. 5614 – 5620, 2001.
- WEISSINGER, W. R., BEUCHAT, L. R. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate Salmonella on alfalfa seeds. **J. Food Protec.**, v. 11, p. 1475-1482, 2000.
- YASUDA-YASUKI, Y. S., NAMIKI-KANIE, HACHISAKA Y. Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols. **ASM Spores**, p. 113–116, 1978,.
- ZAFER, A., TAYLOR, Y. E., SATTAR, S. A. Rapid screening method for mycobactericidal activity of chemical germicides that uses *Mycobacterium terrae* expressing a green fluorescent protein gene. **Appl. Environ. Microb.**, v. 67, p. 1239–1245, 2001.

Anexo - Artigos já publicados e aceitos para publicação

(i) The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs - BMC Infectious Diseases.

(ii) Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes - BMC Infectious Diseases.

(iii) Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system - BMC Public Health.

(iv) Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in water purification system - BMC Infectious Diseases.

(v) Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from a clarified *E. coli* cell lysate using a two-phase aqueous micellar system - Biotechnology and Bioengineering.

(vi) Stability of Green Fluorescent Protein (GFP) in Chlorine Solutions of Varying pH - Biotechnology Progress (aceito para publicação).