

Influência do meio suporte na inativação de endósporos de *Bacillus atrophaeus* em resíduos de serviços de saúde por micro-ondas

Support influence on microwave inactivation of Bacillus atrophaeus spores in healthcare waste

Elisa Augusta de Oliveira¹, Reinaldo Pisani Júnior²

RESUMO

A Norma Técnica CETESB P2.111/2007 foi tomada como base para avaliar a desinfecção de resíduos de serviços de saúde (RSS) por micro-ondas, através da comparação dos resultados provenientes da utilização da norma, ou seja, com endósporos de *Bacillus atrophaeus* em suspensão no interior de ampolas introduzidas nos RSS, com os obtidos nos endósporos dispersos na superfície das partículas. Os resultados foram ajustados à cinética de primeira ordem e à Lei de Arrhenius para obtenção das energias de ativação (E_a) e dos fatores pré-exponenciais (k_0). A E_a obtida nos endósporos em suspensão nas ampolas (99-45 J.mol⁻¹) foram sensivelmente menores quando comparadas com as E_a (9.203-5.782 J.mol⁻¹) provenientes da inativação dos endósporos dispersos sobre os RSS, para k_0 praticamente constantes (0,26 e 0,23 min⁻¹, respectivamente). Portanto, a resistência à inativação dos endósporos foi bastante afetada pelo meio suporte utilizado, tendo sido mais sensíveis à exposição a micro-ondas no meio líquido do que no meio sólido.

Palavras-chave: *Bacillus atrophaeus*; endósporos; inativação; micro-ondas; resíduos de serviços de saúde.

ABSTRACT

The Technical Standard CETESB P2.111/2007 was tested to evaluate the microwave healthcare waste disinfection, by comparing the results obtained using the standard procedure, i.e. *Bacillus atrophaeus* spores in suspension inside vials distributed in the waste, with those obtained with spores dispersed on the particles surface. The experimental results were adjusted based on first-order kinetic model and Arrhenius Law to determine the activation energies (E_a) and the pre-exponential factors (k_0). The E_a in spores suspension inside vials (99-45 J.mol⁻¹) were significantly lower when compared with E_a (9,203-5,782 J.mol⁻¹) from the inactivation of dispersed spores in the waste to k_0 practically constant (0.26 and 0.23 min⁻¹, respectively). Therefore, spore resistance to inactivation was greatly affected by the support medium used, since the spores were more susceptible to microwave exposition in liquid medium than in the solid one.

Keywords: *Bacillus atrophaeus*; spores; inactivation; microwave; healthcare waste.

INTRODUÇÃO

O descarte inadequado de resíduos tem produzido passivos ambientais capazes de colocar em risco a qualidade dos recursos naturais e comprometer o bem-estar de atuais ou futuras gerações. Os resíduos de serviço de saúde (RSS) se inserem nesse contexto por exporem a risco biológico potencial os envolvidos nas etapas de manejo, tratamento e disposição final.

A técnica de tratamento de RSS por micro-ondas tem sido cada vez mais empregada no Brasil e no exterior (EDLICH *et al.*, 2006).

A capacidade total instalada de sistemas de tratamento de RSS no Brasil em 2012 foi 234.654 t/ano, sendo que 21,7% (50.856 t/ano) empregaram a desinfecção com micro-ondas (ABRELPE, 2013).

Um sistema típico de desinfecção por micro-ondas é formado por 4 a 6 fontes (magnetrons) com frequência de 2.450 MHz, cada uma operando com 1.400 W de potência. Portanto, a potência total dissipada para inativação dos resíduos varia de 5.600 a 8.400 W. O sistema pode processar até 250 kg/h de resíduos em bateladas de 177 kg a cada 42,5 min. O tempo de exposição à radiação é

¹Engenheira Civil pelo Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto (SP); Mestre em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

²Engenheiro Químico; Mestre e Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - São Carlos (SP); Professor e Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da UNAERP - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Reinaldo Pisani Júnior - Rua José Bonifácio, 787 - 13560-610 - São Carlos (SP), Brasil - E-mail: pisanijr@terra.com.br

Fonte de financiamento: Universidade de Ribeirão Preto.

Recebido: 06/03/12 - **Aceito:** 13/03/15 - **Reg. ABES:** 84102

tipicamente 30 min e a umidade dos resíduos é ajustada para 50% em massa (base úmida). Normalmente, o equipamento processa 180 kg/h de resíduos, ou seja, bateladas de 127 kg em 42,5 min com 30 min de exposição à radiação. Assim, a unidade em escala real opera com uma relação de potência por unidade de massa do resíduo (P/M) no intervalo de 62 a 93 W/kg (PISANI JR. *et al.*, 2008; TONUCCI *et al.*, 2008).

Diversos estudos a partir da década de 1960 investigaram o processo de inativação de microrganismos por micro-ondas em comparação ao aquecimento convencional. Em geral, esses estudos não obtiveram diferenças significativas nos resultados obtidos com os dois tipos de processos. No entanto, é importante notar que as condições experimentais (potência por unidade de massa, estado físico do meio suporte e tempo de irradiação) eram muito diferentes das condições de funcionamento de sistemas de micro-ondas para desinfecção dos RSS (FUJIKAWA *et al.*, 1992; GOLDBLITH & WANG, 1967; JENG *et al.*, 1987; KOUTCHMA *et al.*, 2001; LECHOWICH *et al.*, 1969; VELA & WU, 1979; WELT *et al.*, 1994; YEO *et al.*, 1999).

Mais recentemente, foi estabelecido o efeito da radiação do tipo micro-ondas na estrutura celular e na energia de ativação da inativação microbiológica (CELANDRONI *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2000; WU, 2008; YAGHMAEE & DURANCE, 2005). Setlow (2006) analisou os danos e os mecanismos de resistência à inativação de *Bacillus subtilis* pelo calor, radiação e produtos químicos. Concluiu que nem todos os aspectos envolvidos na inativação eram conhecidos, mas normalmente estavam presentes danos ao DNA ou à membrana interna do microrganismo.

No caso de se avaliar a desinfecção de RSS por micro-ondas, Cole *et al.* (1993) propuseram que tiras ou bolsas feitas de materiais permeáveis fossem inoculadas com 10^4 a 10^8 endósporos de *Bacillus subtilis* para serem inseridas na massa de resíduos e processadas em condição normal de operação. Recomendaram que, para se atingir o Nível III de inativação com micro-ondas, a exposição à radiação deveria ser de pelo menos duas horas e a temperatura interna dos resíduos deveria ser mantida em pelo menos 90°C durante todo ciclo.

Os RSS são classificados pela Resolução CONAMA 358/2005 (CONAMA, 2005) em resíduos dos grupos A, B, C, D e E, sendo os grupos A e E (exceto A_3 e A_2) o foco do estudo devido ao potencial patogênico e composição heterogênea. A resolução estabelece que os resíduos dos subgrupos A_1 e A_2 , em conjunto com os resíduos do grupo E, têm de atender ao Nível III de inativação, ou seja, 6.Log10 para células vegetativas e 4.Log10 para endósporos do gênero *Bacillus spp.*

Tonucci *et al.* (2008) determinaram os parâmetros cinéticos para a inativação por micro-ondas de *Escherichia coli* em resíduos de serviço de saúde típico. A umidade do resíduo na entrada foi mantida em 50% (base úmida) e a potência por unidade de massa variou

de 60 a 100 W/kg. O fator pré-exponencial (k_0) obtido foi igual a $2,31 \text{ min}^{-1}$. A energia de ativação (E_a) diminuiu com a potência por unidade de massa e os seguintes valores foram encontrados: 10.071, 8.892 e 7.594 J.mol^{-1} , respectivamente, para 60, 80 e 100 W/kg. Assim, o tempo de irradiação necessário para atingir o Nível III de inativação (6.Log10 para célula vegetativa) para esse indicador biológico a 80 W.kg^{-1} e com temperatura constante de 100°C seria de 105 min, que é muito superior ao tempo utilizado em um sistema em escala real (30 min).

Pisani Jr. *et al.* (2008) utilizaram as mesmas condições de Tonucci *et al.* (2008) e obtiveram o fator pré-exponencial de Arrhenius (k_0) de $10,7 \text{ min}^{-1}$ e a E_a praticamente constante com um valor médio de 13.990 J.mol^{-1} , em função da P/M no intervalo de 60 a 100 W.kg^{-1} , utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (células vegetativas) como indicador biológico. Assim, o tempo de irradiação para atingir o nível de inativação equivalente a 6.Log10 seria de aproximadamente 80 min a 100°C, que também foi maior que o tempo de irradiação de micro-ondas em escala real.

Oliveira *et al.* (2010) determinaram a fração de inativação dos endósporos de *Bacillus atrophaeus* artificialmente inoculados em RSS com umidade de 50% em base úmida, em função do tempo de exposição à radiação micro-ondas (20 a 40 min) e da potência por unidade de massa de resíduo (100, 150 e 200 W.kg^{-1}). Obtiveram inativação máxima de 71% para os endósporos dispersos na superfície das partículas que compuseram o resíduo. Ajustaram um modelo de primeira ordem aos resultados experimentais para obter a E_a (9.203 J.mol^{-1} para 100 W.kg^{-1} , 7.151 J.mol^{-1} para 150 W.kg^{-1} e 5.782 J.mol^{-1} para 200 W.kg^{-1}) e o fator pré-exponencial de Arrhenius ($0,23 \text{ min}^{-1}$). Concluíram que esse sistema de desinfecção não era capaz de atender ao Nível III de inativação microbiana, quando operado nos moldes dos equipamentos em escala real.

A Norma Técnica CETESB P2.111/2007 (CETESB, 2007) estipulou que a avaliação de desempenho de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente devia ser feita através de teste com os bioindicadores *Bacillus atrophaeus* (*Bacillus subtilis* DSM 675 ou *Bacillus subtilis* DSM 2277) ou *Geobacillus stearothermophilus*, com a utilização de suspensões de endósporos viáveis. Os endósporos dos bioindicadores poderiam ser usados em suspensão, ou impregnados em fitas de papel de filtro, pérolas de vidro ou em cilindros de porcelana. O teste consistia em colocar seis ampolas hermeticamente fechadas contendo microrganismos, no interior do equipamento, juntamente com o resíduo a ser processado. Após a passagem pelo equipamento de micro-ondas, as ampolas eram retiradas e ocorria a contagem de colônias para a validação da inativação microbiana. As placas para contagem deveriam apresentar entre 10 e 300 colônias para calcular o número de endósporos por mL da suspensão

original. Essa norma foi suspensa pelo órgão ambiental do Estado de São Paulo a partir de 2012, porém sem divulgação de justificativa técnica que levou à suspensão, apesar de vigorar por aproximadamente 5 anos (CETESB, 2014).

O objetivo do estudo consistiu em verificar as influências das condições operacionais, potência por unidade de massa de resíduo e tempo de exposição, na inativação de endósporos de *Bacillus atropheus* em suspensão líquida no interior de ampolas. Determinar os parâmetros cinéticos do processo de desinfecção nas condições estabelecidas. Comparar os valores obtidos em ampolas com os resultados de inativação dos endósporos dispersos na massa de resíduo obtidos por Oliveira *et al.* (2010). E verificar se o estado físico do meio suporte interferiu na inativação de endósporos por exposição a micro-ondas de RSS.

METODOLOGIA

O estudo envolveu as etapas de: esporulação do microrganismo; ensaio de desinfecção de endósporos de *B. atropheus* na forma de suspensão em meio de cultura BHI em ampolas de 1,8 mL distribuídas no resíduo e tratamento dos dados experimentais com base no modelo cinético de primeira ordem para determinação da E_a e do fator pré-exponencial de Arrhenius.

Os resíduos utilizados no estudo foram coletados em um centro de tratamento de RSS dos grupos A e E por micro-ondas, localizado no município de Jardinópolis, que processa resíduos de vários municípios da região de Ribeirão Preto (SP), Brasil. Amostras diárias de aproximadamente 200 L foram coletadas em 7 dias consecutivos para compor o montante de RSS utilizado no estudo. Embora esse material já tivesse sido processado pelo sistema de micro-ondas, foi feita a sua esterilização em autoclave no laboratório, a fim de evitar possíveis riscos de contaminação. Após a autoclavagem, os resíduos foram espalhados em uma lona de plástico para secar ao ar, a temperatura ambiente, até que a umidade atingisse cerca de 5% (em base úmida). O resíduo, em seguida, foi caracterizado, utilizando o método do quarteamento para classificar o material e obter uma massa representativa de 2 kg de resíduos. A composição gravimétrica da amostra foi determinada por separação manual, sua massa específica aparente foi determinada pelo método da proveta e sua distribuição de tamanho foi feita por peneiramento.

Os experimentos foram conduzidos em um forno de micro-ondas doméstico, calibrado previamente, da marca SHARP modelo Browner R4B82 com uma capacidade de cerca de 20 L (Figura 1), que opera na frequência de 2.450 MHz.

A massa de resíduos para cada teste (762, 508 e 381 g, respectivamente) foi determinada com base na potência real dissipada com 10%

da potência nominal (76,2 W) e nas relações de potência por unidade de massa de resíduo de 100, 150 e 200 W.kg⁻¹.

Na desinfecção dos RSS por micro-ondas, uma elevação na temperatura provoca um aumento na taxa de inativação dos microrganismos. Assim, as temperaturas do centro da massa do resíduo e do interior da ampola foram avaliadas em função da P/M (100, 150 e 200 W.kg⁻¹) e do tempo de exposição para a umidade do RSS de 50% em base úmida.

A suspensão de endósporos de *Bacillus atropheus* ATCC 9372 (CEFAR, SP, Brasil) foi preparada, incluindo hidratação, crescimento e esporulação do microrganismo para o experimento de acordo com a Norma CETESB P2111/2007.

A porcentagem de microrganismos esporulados foi determinada a partir de lâminas preparadas pelo método de Gram e pelo método de Wirtz-Conklin. O número de endósporos foi determinado por contagem em duplicata de 1.000 elementos (endósporos e células vegetativas), dos quais 94% estavam na forma de endósporos, observados em lâminas com um microscópio ótico.

Os testes foram executados em duplicata. Em cada ensaio, três ampolas eram distribuídas na massa de resíduo, sendo uma na parte superior, uma no centro e outra na parte inferior da massa de resíduo. As ampolas tinham 1,8 mL de volume útil e continham suspensão de *B. atropheus* com cerca de 10⁷ endósporos.

A fração de inativação (X) foi calculada a partir da Equação 1:

$$X(\%) = \left(\frac{N_0 - N}{N_0} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

na qual:

N_0 : número de microrganismos inoculados na ampola (UFC);

N: número de microrganismos recuperados de cada ampola após o tratamento para cada tempo de exposição à radiação (UFC).



Figura 1 - Forno de micro-ondas com indicação do resíduo e do termopar.

A integração do modelo cinético de primeira ordem associado à Lei de Arrhenius relacionou X com os parâmetros cinéticos (E_a e k_0), constante universal dos gases perfeitos (R), temperatura (T) e tempo (t) — Equação 2.

$$X(\%) = 1 - \exp \left[\int_0^t k_0 \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{R \cdot T}\right)} \cdot dt \right] \quad (2)$$

Uma vez que os experimentos de desinfecção em batelada ocorreram em condição não isotérmica em função do tempo de processamento, foi preciso levar em consideração a variação da temperatura (T) ao longo do tempo de cada ensaio (t). A dependência da temperatura em função do tempo foi obtida experimentalmente para cada potência por unidade de massa de resíduo. O ajuste de um polinômio para representar T em função de t permitiu a integração numérica e a determinação dos valores de k_0 e E_a para as condições estudadas.

A integração numérica foi efetuada pelo método de Simpson e a determinação de E_a e k_0 foi realizada pelo critério de mínimos quadrados. A qualidade do ajuste entre os valores experimentais e calculados foi avaliada através dos coeficientes de determinação (R^2 , Equação 3) e das raízes quadradas dos erros médios ao quadrado (RMSE, Equação 4) (WILLMOTT, 1982).

$$R^2 = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n [X_{\text{experimental}} - X_{\text{experimental_modelo}}] \cdot [X_{\text{modelo}} - X_{\text{modelo_modelo}}]}{\sum_{i=1}^n (X_{\text{experimental}} - X_{\text{experimental_modelo}})^2 \cdot \left[\sum_{i=1}^n (X_{\text{modelo}} - X_{\text{modelo_modelo}})^2 \right]^{0,5}} \right\}^2 \quad (3)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [X_{\text{experimental}} - X_{\text{modelo}}]^2}{n}} \quad (4)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, são apresentadas a composição gravimétrica e a massa específica aparente dos RSS utilizados no estudo. Nota-se pela Tabela 1 que 49,0% dos RSS são compostos por materiais hidrofóbicos (plástico, látex e poliestireno), o que pode interferir negativamente no aquecimento, uma vez que a ação das micro-ondas ocorre apenas na porção úmida.

No procedimento descrito na Norma CETESB P2.111/2007, o teste efetuado para avaliar a inativação devia ocorrer com ampolas colocadas no interior dos resíduos, contendo o microrganismo em meio de cultura BHI líquido. Para cada uma das 15 condições experimentais abordadas, foram adicionadas 3 ampolas, uma na parte superior (em cima), uma no centro geométrico (centro) e outra no fundo (embaixo)

das massas de RSS que compuseram as amostras, totalizado 45 valores de fração de inativação (X_i). Na Tabela 2, são mostradas as frações de inativação nas ampolas (X_i) obtidas, as frações médias (X) com os respectivos desvios padrão (%) em função do tempo e da potência útil por unidade de massa dos resíduos.

Nota-se pelos resultados da Tabela 2 que as frações de inativação nas ampolas estiveram no intervalo de 99,4 a 99,8%, com desvio padrão associado inferior a 0,10%, e que apresentaram leve tendência de aumentar em função do tempo de exposição (X_i e X), mantida a relação P/M. Porém, não houve variação significativa de X_i e X ao se elevar a relação P/M de 100 W.kg⁻¹ para 200 W.kg⁻¹ para os mesmos tempos de exposição, independentemente da posição dos frascos no interior da massa de RSS. Já na Tabela 3, são mostrados os resultados obtidos para a fração de inativação dos endósporos em suspensão no interior das ampolas (experimentais e calculados pelo modelo de primeira ordem), assim como as frações de inativação dos microrganismos dispersos diretamente nas amostras de RSS determinadas por Oliveira *et al.* (2010).

Nota-se pela Tabela 3 que o modelo foi capaz de representar o comportamento dos resultados experimentais da fração de inativação dos endósporos nas ampolas, porém tendeu a superestimar X , mesmo quando são considerados os desvios padrão para cada condição, apesar de os valores experimentais e calculados serem bastante próximos em termos absolutos. Por outro lado, ambas as frações de inativação medidas e previstas (modelo de primeira ordem) para suspensão em ampolas foram bastante superiores às frações de inativação para os endósporos dispersos na superfície do resíduo, ou seja, não houve representatividade entre as inativações dos endósporos dispersos nos RSS e no interior das ampolas.

Tabela 1 – Composição gravimétrica e massa específica aparente dos resíduos de serviço de saúde.

Material	% em massa
Papel/tecido	39,3
Plástico duro	24,7
Plástico filme	13,2
Látex	10,5
Metal	4,4
Vidro	2,1
Osso	1,6
Madeira	1,1
Poliestireno	0,6
Outros: poeira, papelão e outros materiais de difícil separação	2,6
Total	100,0
Massa específica para umidade de 50% (base úmida)	128 kg.m ⁻³

Para aplicação do modelo cinético, foi preciso determinar a temperatura do líquido no interior das ampolas e na massa da amostra de RSS. Na Figura 2, são mostradas as temperaturas da suspensão de endósporos no interior das ampolas e do centro da massa de RSS em função do tempo.

Observa-se pela Figura 2 que a temperatura do meio líquido nas ampolas é aproximadamente 15°C superior à temperatura do RSS para as mesmas condições experimentais. Apesar disso, a Lei de Arrhenius permitiu separar os efeitos das diferentes temperaturas dos processos de inativação nos meios suportes (líquido nas ampolas e

Tabela 2 - Frações de inativação de endósporos de *Bacillus atrophaeus* em suspensão líquida do meio de cultura no interior das ampolas e distribuídos sobre as amostras de resíduos de serviço de saúde.

Tempo (min)	Posição da ampola na amostra de RSS	100 W.kg ⁻¹		150 W.kg ⁻¹		200 W.kg ⁻¹	
		X _i	X	X _i	X	X _i	X
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
20	Centro	99,5	99,5±0,06	99,5	99,5±0,10	99,5	99,5±0,06
	Embaixo	99,4		99,6		99,6	
	Em cima	99,5		99,4		99,5	
25	Centro	99,6	99,6±0,06	99,5	99,5±0,10	99,5	99,6±0,10
	Embaixo	99,5		99,4		99,7	
	Em cima	99,6		99,6		99,6	
30	Centro	99,8	99,8±0,00	99,7	99,7±0,06	99,6	99,6±0,06
	Embaixo	99,8		99,6		99,7	
	Em cima	99,8		99,7		99,6	
35	Centro	99,8	99,8±0,06	99,8	99,7±0,10	99,7	99,7±0,06
	Embaixo	99,8		99,6		99,7	
	Em cima	99,7		99,7		99,6	
40	Centro	99,7	99,8±0,06	99,7	99,8±0,06	99,8	99,7±0,06
	Embaixo	99,8		99,8		99,7	
	Em cima	99,8		99,8		99,7	

RSS: resíduos de serviço de saúde.

Tabela 3 - Frações de inativação experimentais e calculadas pelo modelo de primeira ordem para endósporos de *Bacillus atrophaeus* na suspensão líquida do meio de cultura no interior das ampolas presentes nos resíduos de serviço de saúde.

Tempo (min)	P/M (W.kg ⁻¹)	X _{experimental} ampola (%)	X _{modelo} ampola (%)	R ² (-)	RMSE (%)	X _{experimental} na superfície do resíduo (Oliveira et al., 2010)
						(%)
20	100	99,5±0,06	99,3	0,99999	0,18	15
25		99,6±0,06	99,8			20
30		99,8±0,00	99,9			22
35		99,8±0,06	100,0			22
40		99,8±0,06	100,0			33
20	150	99,5±0,10	99,3	0,99998	0,24	34
25		99,5±0,10	99,8			39
30		99,7±0,06	99,9			43
35		99,7±0,10	100,0			46
40		99,8±0,06	100,0			49
20	200	99,5±0,06	99,4	0,99998	0,24	36
25		99,6±0,10	99,8			53
30		99,6±0,06	100,0			60
35		99,7±0,06	100,0			70
40		99,7±0,06	100,0			71

P/M: relação de potência por unidade de massa do resíduo; X: fração de inativação; R²: coeficientes de determinação; RMSE: raízes quadradas dos erros médios ao quadrado.

sólido no resíduo), pois utiliza como variáveis independentes E_a , k_0 e T isoladamente.

De posse da fração de inativação dos endósporos para cada intervalo de tempo e das funções de temperatura ajustadas, foram determinados os valores de k_0 , E_{a1} , E_{a2} e E_{a3} , respectivamente para as potências de 100, 150 e 200 $W.kg^{-1}$, pelo método dos mínimos quadrados. No processo de minimização da somatória dos erros ao quadrado, o fator pré-exponencial k_0 foi admitido constante para cada meio, analogamente às reações químicas, uma vez que o reagente (microrganismo) é único, para as três potências em relação à massa.

Os valores obtidos para a inativação dos endósporos dispersos na massa de resíduos foram: $k_0=0,23 \text{ min}^{-1}$ e $E_{a1}=9.203 \text{ J.mol}^{-1}$ para 100 $W.kg^{-1}$, $E_{a2}=7.151 \text{ J.mol}^{-1}$ para 150 $W.kg^{-1}$ e $E_{a3}=5.782 \text{ J.mol}^{-1}$ para 200 $W.kg^{-1}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Já para os endósporos em suspensão no interior das ampolas, foram: $k_0=0,26 \text{ min}^{-1}$ e $E_{a1}=90 \text{ J.mol}^{-1}$ para 100 $W.kg^{-1}$, $E_{a2}=99 \text{ J.mol}^{-1}$ para 150 $W.kg^{-1}$ e $E_{a3}=45 \text{ J.mol}^{-1}$ para 200 $W.kg^{-1}$, que resultaram em R^2 bastante próximos a 1,0 e RMSE no intervalo de 0,18 a 0,24% (Tabela 3), o que permitiu comprovar que o modelo de primeira ordem foi capaz de descrever as frações de inativação de endósporos no interior das ampolas. Verificou-se, também, que os valores dos fatores pré-exponenciais foram praticamente constantes, enquanto que as energias de ativação foram bastante distintas, ou seja, tiveram uma diminuição média da ordem de 100 vezes, isto é, a inativação dos endósporos foi facilitada no meio líquido em relação ao meio sólido.

O aumento da potência por unidade de massa causou tendência de diminuição da energia de ativação. A energia de ativação decrescente com a relação P/M indicou que ocorreu um efeito da radiação

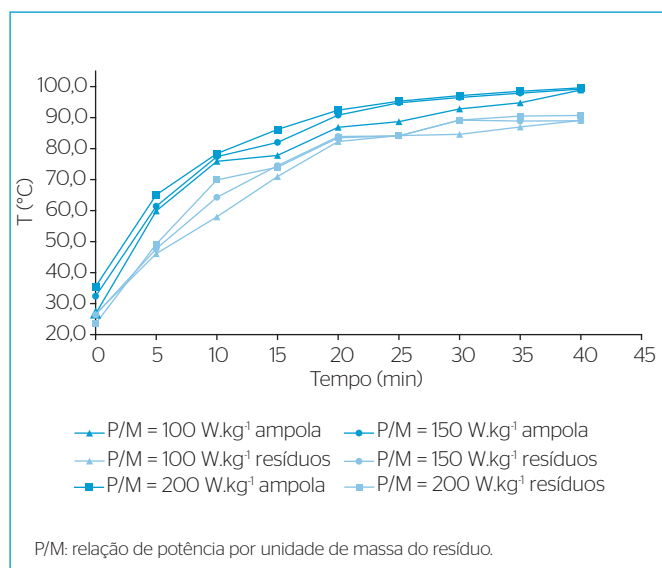


Figura 2 - Temperaturas da suspensão de endósporos no interior das ampolas e do centro da massa de resíduos de serviço de saúde em função do tempo.

no processo de inativação do microrganismo. Esse efeito, segundo a Lei de Arrhenius, causa aumento da constante de velocidade e da taxa de inativação dos microrganismos.

A energia de ativação, o fator pré-exponencial de Arrhenius e o modelo cinético de primeira ordem permitiram avaliar a técnica de tratamento através da previsão do tempo de inativação necessários para se obterem os níveis de desinfecção $4.Log_{10}$. Esses valores correspondem à entrada de 1.000.000 de microrganismos e à saída de 100, o que, expresso na forma de fração de inativação, equivale a 99,99%. A literatura cita que a temperatura do processo em escala real é de aproximadamente 100°C; sendo assim, fez-se a simulação do processo para se calcular o tempo necessário para se atingir o Nível III de inativação. Na Tabela 4, podem-se observar os resultados obtidos para essa simulação.

Nota-se, pelos tempos necessários para inativar 99,99% dos endósporos da Tabela 4, de 36 a 37 min para os microrganismos em suspensão líquida nas ampolas e de 258 a 779 min para os endósporos dispersos sobre as partículas dos RSS, que o teste realizado a partir da Norma CETESB P2.111/2007 não representou a inativação de endósporos de *B. atrophaeus* na superfície dos RSS, quando expostos à radiação de micro-ondas. Os resultados decorrentes da utilização do procedimento descrito na norma subestimaram consideravelmente os tempos de inativação para valores semelhantes aos praticados em equipamentos em escala real (30–42,5 min) e, ao mesmo tempo, não representaram a inativação dos endósporos realmente dispersos na massa de RSS; portanto, o meio suporte influenciou fortemente a inativação microbiana nas condições estudadas.

CONCLUSÃO

O método de ensaio, baseado na Norma CETESB P2.111/2007, para avaliar inativação microbiana de sistemas de aquecimento dielétrico por micro-ondas, não foi capaz de representar a inativação dos endósporos de *Bacillus atrophaeus* dispersos nos RSS nas condições estudadas. As frações de inativação experimentais do microrganismo no interior das ampolas estiveram no intervalo de $99,5 \pm 0,06$ a $99,8 \pm 0,06\%$, enquanto que, dispostos diretamente nas massas de RSS, foram de 15 a 71%,

Tabela 4 - Simulação pelo modelo de primeira ordem para a previsão do tempo necessário para inativação do microrganismo equivalente a $4.Log_{10}$ em suspensão nas ampolas e dispersos na superfície do resíduo para 100°C.

P/M ($W.kg^{-1}$)	Tempo para inativação nas ampolas (min)	Tempo para inativação no resíduo (min)
100	36	779
150	37	402
200	36	258

P/M: relação de potência por unidade de massa do resíduo.

respectivamente, para as relações P/M de 100 a 200 W.kg⁻¹ e tempos de exposição de 20 a 40 min.

Os tempos de desinfecção necessários para se atingirem os níveis de inativação microbiana equivalentes a 4.Log10 foram estimados entre 259 e 779 min para os endósporos de *B. atrophaeus* dispersos diretamente nos RSS e de 36 a 37 min para os microrganismos em suspensão no interior das ampolas distribuídas nos RSS.

O modelo de primeira ordem foi capaz de descrever o comportamento e os valores das frações de inativação de endósporos no interior das ampolas, com base nos valores obtidos de R² e de RMSE.

Verificou-se, também, que a inativação dos endósporos foi facilitada no meio líquido em relação ao meio sólido, pois, apesar de os valores dos fatores pré-exponenciais terem sido próximos (0,26 min⁻¹ no interior das ampolas e 0,23 min⁻¹ fora delas), os intervalos de energia de ativação foram bastante distintos (45–99 J.mol⁻¹ nas ampolas e 5.782–9.203 J.mol⁻¹ nas partículas dos RSS), ou seja, tiveram uma diminuição média da ordem de 100 vezes.

Portanto, ficou demonstrado, através de resultados experimentais e de utilização do modelo cinético de primeira ordem, nas condições operacionais abordadas, que o estado físico dos meios que contiveram o bioindicador interferiu acentuadamente no processo de inativação dos endósporos de *B. atrophaeus* por exposição de RSS a micro-ondas.

REFERÊNCIAS

- ABRELPE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE LIMPEZA PÚBLICA E RESÍDUOS ESPECIAIS (2013) *Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2012*. São Paulo: ABRELPE. 114 p.
- CELANDRONI, F.; LONGO, I.; TOSORATTI, N.; GIANNESI, F.; GHELARDI, E.; SALVETTI, S.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. (2004) Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, n. 6, p. 1220-1227.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (2007) Avaliação de eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente através do teste com os bioindicadores *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*. P2.111. São Paulo: CETESB.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (2014) Lista de normas técnicas CETESB suspensas, atualizada em 15/10/2012. Disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/servicos/normas/desativadas.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2014.
- COLE, E.C.; PIERSON, T.K.; GREENWOOD, D.R.; LEESE, K.E.; FOARDE, K.K. (1993) Guidance for Evaluating Medical Waste Treatment Technologies. EPA-68-WO-0032. Washington: US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (2005) *Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005*. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Publicada no Diário Oficial da União nº 84, de 4 de maio de 2005, Seção 1, p. 63-65.
- EDLICH, R.F.; BOREL, L.; JENSEN, G.; WINTERS, K.L.; LONG III, W.B.; DEAN GUBLER, K.; BUSCHBACHER, R.M.; BECKER, D.G.; CHANG, D.E.; KORNGOLD, J.; CHITWOOD JR., W.R.; LIN, K.Y.; NICHTER, L.S.; BERENSON, S.; BRITT, L.D.; TAFEL, J.A. (2006) Revolutionary advances in medical waste management. The Sanitec® System. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, v. 16, n. 1, p. 1-10.
- FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; KUDO, Y. (1992) Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 3, p. 920-924.
- GOLDBLITH, S.A. & WANG, D.I.C. (1967) Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1371-1375.
- JENG, D.K.H.; KACZMAREK, K.A.; WOODWORTH, A.G.; BALASKY, G. (1987) Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 9, p. 2133-2137.
- KOUTCHMA, T.; LE BAIL, A.; RAMASWAMY, H.S. (2001) Comparative experimental evaluation of microbial destruction in continuous-flow microwave and conventional heating systems. *Canadian Biosystems Engineering*, v. 43, n. 3, p. 31-38.
- LECHOWICH, R.V.; BEUCHAT, L.R.; FOX, K.I.; WEBSTER, F.H. (1969) A procedure for evaluating the effects of 2,450-Megahertz microwaves upon *Streptococcus faecalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 106-110.
- OLIVEIRA, E.A.; NOGUEIRA, N.G.P.; INNOCENTINI, M.D.M.; PISANI JR., R. (2010) Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste. *Waste Management*, v. 30, n. 11, p. 2327-2335.
- PISANI JR., R.; TONUCCI, L.R.S.; INNOCENTINI, M.D.M. (2008) Inativação de *Pseudomonas aeruginosa* em resíduos de serviços de saúde por microondas. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 13, n. 3, p. 284-290.
- SETLOW, P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 3, p. 514-525.
- TONUCCI, L.R.S.; PASCHOALATO, C.F.P.R.; PISANI JR., R. (2008) Microwave inactivation of *Escherichia coli* in healthcare waste. *Waste Management*, v. 28, n. 5, p. 840-848.

VELA, G.R. & WU, J.F. (1979) Mechanism of lethal action of 2,450-MHz radiation on microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 550-553.

WELT, B.A.; TONG, C.H.; ROSSEN, J.L.; LUND, D.B. (1994) Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 482-488.

WILLMOTT, C.J. (1982) Some comments on the evaluation of model performance. *Bulletin of the American Meteorological Society*, v. 63, n. 11, p. 1309-1313.

WOO, I.; RHEE, I.; PARK, H. (2000) Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 2243-2247.

WU, T. (2008) Environmental perspectives of microwave applications as remedial alternatives: review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, v. 12, n. 2, p. 102-115.

YAGHMAEE, P. & DURANCE, T.D. (2005) Destruction and injury of *Escherichia coli* during microwave heating under vacuum. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 498-506.

YEO, C.B.A.; WATSON, I.A.; STEWART-TULL, D.E.S.; KOH, V.H.H. (1999) Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, n. 3, p. 396-401.