

**AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE ENDÓSPOROS DE *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* NO TRATAMENTO DE RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE POR AUTOCLAVAGEM**

**Amanda Borges Ribeiro de Oliveira (\*), Valdir Schalch**

\* Núcleo de Estudo e Pesquisa em Resíduos Sólidos (Neper) do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP). E-mail: abramanda@hotmail.com

**RESUMO**

Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), ainda que tratados e dispostos em aterros sanitários, podem ser causas de impactos ambientais por apresentarem algum indicador de periculosidade. Segundo a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) RDC nº 222/2018, para as tecnologias de tratamento desses resíduos é necessário que se atinja pelo menos o Nível III de inativação microbiana. Perante a ausência de dados na literatura que revelassem o tempo de exposição, temperatura e pressão ideais para a inativação microbiana no tratamento de RSS por autoclavagem e se a fração ocupada dos resíduos na autoclave poderia interferir na eficiência da desinfecção definiu-se o objetivo do trabalho para otimização do processo. Esta pesquisa foi desenvolvida com base na proposta metodológica de Oliveira (2017) estruturada para avaliar o tratamento de RSS por autoclavagem. Para os testes foram utilizados endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* como bioindicadores e instalados cinco termopares na autoclave para aferição da temperatura dentro de todo o espaço da câmara. O RSS foi sintetizado diante das caracterizações como composição gravimétrica, distribuição granulométrica, densidade específica aparente, massa específica aparente e teor de umidade. Realizou-se ensaios com 116°C, 125°C e 134°C, observando a fração de inativação em seis tempos de exposição diferentes. Inoculou-se 10<sup>6</sup> endósporos nas amostras e a recuperação foi feita com filtração após a lavagem dos resíduos, sendo realizada a técnica de "pour plate" para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O mesmo procedimento foi feito com a amostra retirada da autoclave. A fração de inativação dos endósporos atingiu 100% no tempo de 30 minutos de exposição à temperatura máxima de 134°C e pressão absoluta de 2,3 kgf/cm<sup>2</sup>, resultado obtido através da relação do número de micro-organismos recuperados considerados como inoculados e o número de micro-organismos sobreviventes ao tratamento. A fração de ocupação não foi um fator delimitante para a inativação de endósporos, pois a temperatura se manteve a mesma independentemente da quantidade de resíduo submetido à autoclavagem. Um outro objetivo era avaliar experimentalmente a reprodução dos micro-organismos frente às condições operacionais de autoclavagem e do tempo de permanência do rejeito em condições ambientais. Esse estudo comprovou que a inativação nessas condições otimizadas esteriliza o resíduo, sendo que nenhum micro-organismo voltou a se reproduzir após dias expostos em temperatura ambiente, ou seja, não haveria riscos de contaminação em aterro sanitário quando depositados os rejeitos. Ter encontrado essas condições ideais e avaliado o processo de autoclavagem pode significar um grande avanço nas próprias unidades de tratamento, que terão um parâmetro estabelecido para trabalho.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resíduos de Serviços de Saúde, *Geobacillus stearothermophilus*, autoclavagem, inativação microbiana, esterilização.

**ABSTRACT**

Healthcare waste, even when treated and disposed of in landfills, can be causes of environmental impacts because they show some hazard indicator. According to Resolution of the National Health Surveillance Agency of Brazil (Anvisa) RDC nº 222/2018, for healthcare waste treatment technologies, it is necessary to achieve at least Level III of microbial inactivation. The purpose of this research to optimize the process was defined taking into account the absence of data in the literature that revealed the optimal exposure time, temperature and pressure for microbial inactivation through the healthcare treatment by autoclaving and whether the fraction occupied by waste in the autoclave could interfere with the effectiveness of the disinfection. This research was developed based on the methodological approach of Oliveira (2017) structured to evaluate the treatment of healthcare waste by autoclaving. For the tests, endospores of *Geobacillus stearothermophilus* were used as bioindicators and five thermocouples were installed in the autoclave for temperature measurement throughout the chamber space. The healthcare waste was synthesized by characterizations such as gravimetric composition, granulometric distribution, apparent specific density, apparent specific mass and moisture content. Tests were performed at 116°C, 125°C and 134°C, observing the fraction of inactivation at six different exposure times. The concentration of 10<sup>6</sup> endospores were inoculated in the samples and the recovery was done with filtration after washing the waste, and the "pour plate" technique was used to count the colony forming units. The same procedure was done with the sample removed from the autoclave. The inactivation fraction of the endospores reached 100% in the time of 30 minutes of exposure to the maximum temperature of 134°C and absolute pressure of 2.3 kgf/cm<sup>2</sup>, a outcome obtained by the ratio of the number of recovered microorganisms considered as inoculated and the number of microorganisms



surviving the treatment. The occupation fraction was not a limiting factor for the inactivation of endospores, since the temperature remained the same regardless of the amount of waste submitted to autoclaving. Another objective was to experimentally evaluate the reproduction of the microorganisms taking into consideration the operational conditions of autoclaving and the amount of time that the waste remains under environmental conditions. This study proved that the inactivation under these optimized conditions sterilizes the waste, and that no microorganism would reproduce again after days exposed at room temperature, therefore, there would be no risk of contamination in a landfill when the waste is deposited. Having found these ideal conditions and evaluated the autoclaving process can mean a major advance in the treatment units themselves, which will have an established parameter for work.

**KEY WORDS:** Healthcare waste, *Geobacillus stearothermophilus*, autoclaving, microbial inactivation, sterilization.

## INTRODUÇÃO

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), ainda que tratados e dispostos em aterros sanitários, podem ser causas de impactos ambientais por apresentarem algum fator de periculosidade. São resíduos perigosos, de acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos (Lei 12.305/2010), pois podem apresentar características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade, patogenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade, e por isso necessitam de tratamento prévio à disposição final.

O sistema de tratamento é um conjunto de procedimentos que alteram as características físico-químicas e biológicas dos resíduos, descaracterizando-os, com os objetivos de minimizar o risco à saúde pública, a preservar o meio ambiente e manter a segurança e a saúde do trabalhador, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa (2006). A autoclavagem é a descontaminação com utilização de vapor em altas temperaturas e pressões. Utiliza o termo descontaminação ao invés de esterilização por considerar que a eficiência do tratamento se dá com 99,9% de inativação de micro-organismos, o que se opõe ao conceito de esterilização, que seria a morte de 100% dos seres vivos. Afirma que os valores usuais de pressão são da ordem dos 3 a 3,5 bar e temperaturas de aproximadamente 135°C, porém não esclarece se essa temperatura é a ideal para o tratamento ou se é a máxima atingida pelo equipamento. O processo de autoclavagem inclui ciclos de compressão e de decompressão de forma a facilitar o contato entre o vapor e os resíduos. O aquecimento dos resíduos em autoclave acontece em regime transiente não-isotérmico, ou seja, desde o início até o fim do processo a temperatura e pressão não se mantêm constantes. Durante o procedimento, o vapor é introduzido na autoclave e o aumento gradual da pressão favorece o contato entre o vapor e os resíduos (Anvisa, 2006). Esse tratamento é aplicado somente a RSS dos grupos A (somente subgrupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) e E, segundo a Anvisa RDC nº 222/2018, sendo necessário que se atinja pelo menos o Nível III de inativação microbiana.

A Norma Técnica da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) E15.010/2011 regulamenta a avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos contaminados biologicamente, por meio do teste com bioindicadores, que para os processos que utilizam calor úmido são as *Geobacillus stearothermophilus*. A norma configura apenas aspectos qualitativos das amostras, quanto à presença dos micro-organismos, sendo que os endósporos não podem ser quantificados, pois a metodologia empregada, regulamentada através da norma P2-112/2016 da Cetesb, utiliza fitas ou tiras contendo populações mínimas de 10<sup>4</sup> endósporos que quando colocadas em meio de cultura específico apenas alteram sua cor na presença de micro-organismos, o que não permite a contagem após o teste.

De acordo com De Vos *et al.* (2009), as *G. stearothermophilus* constituem o maior grupo de bactérias termófilas obrigatórias, com crescimento à 65°C aproximadamente, e habitam solo, águas termais, deserto de areia, as águas do Ártico, sedimentos oceânicos, alimentos e compostos orgânicos.

Havia uma ausência de dados na literatura que revelassem o tempo de exposição, temperatura e pressão ideais para a inativação microbiana e não reprodução dos micro-organismos após tratamento extraestabelecimento. Além de avaliar essas condições, a presente pesquisa também analisou a influência da fração ocupada dos resíduos na autoclave, pois a porosidade do leito fixo formado pelas partículas do resíduo no interior do equipamento poderia interferir na penetração de vapor nos interstícios e consequentemente aumentaria a temperatura da amostra.

Em Ministério da Saúde (2010), ao analisarem a autoclavagem de bolsas de sangue, notaram que a distribuição das bolsas dentro da autoclave e o grau de exposição direta ao calor úmido influenciaram diretamente na eficácia do tratamento. Hossain *et al.* (2012) constataram que o tratamento por autoclavagem de RSS não foi efetivo no sentido de atingir o Nível III de inativação microbiana. Utilizaram células vegetativas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis* mediante tempos de aquecimento de até 60 minutos e temperaturas do vapor na entrada no intervalo de 111°C a 131°C. Observaram o crescimento de bactérias



em amostras de resíduos tratados após dois dias de armazenamento, o que tornou possível concluir que algumas das bactérias sobreviveram e se reproduziram após a desinfecção.

Uma vez comprovada a reprodução de células vegetativas dispersas em amostras de RSS típico, sendo a forma esporulada mais resistente ao estresse ambiental, a proposição do presente estudo consistiu em avaliar tecnicamente a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em RSS, sob as condições operacionais de tratamento extraestabelecimento semelhantes a equipamentos em escala real. A ausência de dados que comprovem a eficácia do processo de autoclavagem seguida da falta de condições pré-estabelecidas como tempo, temperatura e pressão de vapor, além da possibilidade de reprodução dos micro-organismos após tratamento foram os principais propósitos deste estudo. Apesar de ser a tecnologia mais utilizada para tratamento de resíduos infectantes, o processo de tratamento por autoclave pode ser otimizado nas unidades, para atender maiores eficiências na inativação microbiana, eliminando o risco de contaminação em aterro sanitário. Ter atingido a fração de inativação de 100% comprovou que em condição ideal de esterilização (e não apenas desinfecção) os micro-organismos não se multiplicam.

## OBJETIVOS

Avaliar tecnicamente a eficiência do processo de tratamento (extraestabelecimento) de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) por autoclave, para que a inativação microbiana seja atingida mediante condições de tempo, temperatura e pressão otimizadas, de forma que esse resíduo não ofereça risco de contaminação ao meio ambiente quando disposto em aterro sanitário.

### • Objetivos Específicos

Quantificar os níveis de inativação microbiana em função das condições operacionais de temperatura, pressão, tempo de contato e fração volumétrica ocupada da câmara de autoclavagem e avaliar experimentalmente a reprodução dos micro-organismos em RSS tratados frente às condições operacionais de autoclavagem e do tempo de permanência desse rejeito em condições ambientais.

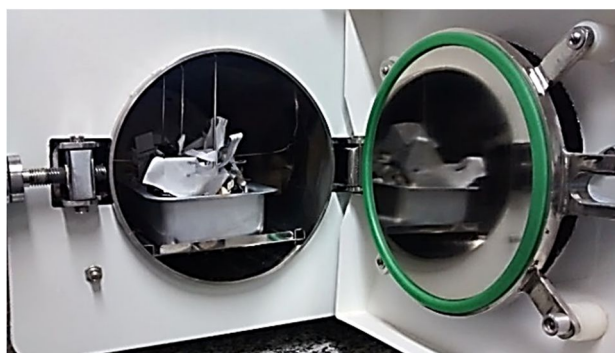
## METODOLOGIA

Esta pesquisa foi desenvolvida com base na proposta metodológica de Oliveira (2017) estruturada para avaliar o tratamento de RSS por autoclavagem, tendo como referência normativa a Anvisa RDC nº 306/2004, vigente naquele momento (revogada por Anvisa RDC nº 222/2018). O objeto de estudo foi a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em RSS, bioindicadores estabelecidos por regulamentações da Anvisa e Cetesb para avaliação de tratamento térmico sem combustão. Os RSS estudados para composição das amostras, foram os pertencentes aos subgrupos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>4</sub>, pois os subgrupos A<sub>3</sub> e A<sub>5</sub> devem receber outras formas de tratamento ou destinação final, segundo a Anvisa RDC nº 306/2004.

### • Caracterização dos resíduos e preparação do material para os ensaios

A primeira etapa constituiu em determinar a composição gravimétrica e granulométrica dos RSS, para síntese das amostras. Para isso, usou-se a gravimetria e granulometria encontrada por Oliveira *et al.* (2010). A síntese foi feita com resíduos classificados, conforme a Norma Brasileira Aprovada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 10004/2004, como Classe II, não-perigosos, procurando-se alcançar características mais próximas dos RSS gerados em estabelecimentos de saúde, e triturados, como no tratamento por autoclave em escala real para garantia de melhor desinfecção devido ao aumento da superfície de contato, e menor área de ocupação em aterro sanitário quando depositados. Em seguida, após amostragem por quarteamento (ABNT NBR 10007/2004), todo o resíduo foi transferido para os sacos, autoclavados por 60 minutos a 121°C e 2,0 kgf/cm<sup>2</sup> e secos em estufa a 35°C por 24 horas.

Através da densidade específica aparente, que foi de 26,90 g/L, foi verificada a massa específica aparente para determinação do volume de material que seria utilizado em cada ensaio. A Figura 1 exibe a ocupação de 1/3 do volume total da autoclave e a localização dos termopares instalados.



**Figura 1: Volume de 1/3 de ocupação da câmara da autoclave e posicionamento dos termopares. Fonte: Autores.**

Para que não houvesse estapolação na bandeja de alumínio utilizada e consequente perda de material e micro-organismos, determinou-se que o ideal seria a ocupação de 1/3 em todos os testes, aproximados 125,53 g. Para cada teste foram utilizadas duas amostras que eram novamente autoclavadas após serem armazenadas em sacos para autoclave, cortados e lacrados por uma seladora. Não sendo necessária a secagem após essa esterilização a 121°C, o material estava pronto para os ensaios. Preparou-se a solução salina a 0,9% com água destilada para lavagem de cada amostra e diluição dos endósporos, que foi armazenada em frascos de vidro com tampa rosqueável, e autoclavou a 121°C. O meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) também era preparado com água destilada, armazenado nos frascos, autoclavados a 121°C e mantidos em Banho Maria. Utilizou-se 20 mL de Agar para cada placa de Petri. Do caldo de Triptona de Soja (TSB) utilizou-se 1 mL para lavagem de cada membrana e plaqueamento, repetiu-se o método de preparo e esterilização do Agar, porém manteve-se em temperatura ambiente até o uso.

Foram instalados cinco termopares na autoclave para aferição da temperatura dentro de todo o espaço da câmara, e enumerados com etiquetas para identificação. A Figura 2 é referente as devidas instalações.



**Figura 2: Equipamentos devidamente instalados para os testes com autoclavagem. Fonte: Autores.**

Os termopares 1, 2, 3, 4 e 5 foram conectados em um indicador de temperatura digital, que transferia os dados durante cada autoclavagem para o computador. Este foi configurado para registrar a temperatura a cada minuto. Os dados coletados eram exportados e assim elaborados os gráficos.

#### • Fração volumétrica ocupada da câmara de autoclavagem

Para analisar a influência da fração volumétrica da massa de resíduos ocupada na autoclave (capacidade total de 14 L) foram feitos dois testes: o primeiro com 2/3 de ocupação, volume anteriormente definido de 250,99 g, e o segundo com 1/3, 125,53 g.

#### • Diluição, plaqueamento e inoculação dos endósporos

Para diluir a suspensão de *G. stearothermophilus*, concentração  $10^8$ , utilizou-se a seguinte fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad \text{equação (1);}$$

sendo:  $C_1$  a concentração inicial,  $10^8$  endósporos/mL;  $C_2$  a concentração a ser utilizada,  $10^6$  endósporos/mL;  $V_2$  o volume a ser utilizado, que foi sempre 1 mL de solução salina. Seriam necessários um volume ( $V_1$ ) de 10  $\mu$ L de suspensão a  $10^8$



diluídos em 990 µL de solução salina para inoculação. Após 24 horas de incubação a 57°C, as bactérias viáveis presentes na amostra formaram colônias, conforme Norma Técnica da Cetesb L5.201/2006. Calculado o número de endósporos por mL, multiplicou-se o volume semeado (1 mL) pelo número de unidades formadoras de colônias contadas (UFC). Dentro da cabina de segurança inoculava-se 1 mL da suspensão diluída de 10<sup>6</sup> endósporos diretamente nas amostras estéreis de resíduo de forma espalhada e agitava-se lentamente.

#### • Os testes de autoclavagem e a recuperação dos endósporos

Os testes para a determinação da fração de inativação de endósporos de *G. stearothermophilus* consistiram em realizar 18 ensaios com autoclavagem de RSS, em diferentes condições operacionais, para observar através de gráficos o resultado dessa fração de acordo com as variações de temperatura (116°C, 125°C e 134°C), pressão absoluta (variando em 1,0 kgf/cm<sup>2</sup>, 1,6 kgf/cm<sup>2</sup> e 2,3 kgf/cm<sup>2</sup>) e tempos de exposição de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min.

Para cada um dos ensaios tinham-se dois testes. O primeiro era o controle, o qual a amostra não receberia o tratamento. O segundo, o autoclavado, que seria analisado qualitativamente e quantitativamente quanto a sobrevivência dos micro-organismos. Do controle obtinha-se o N<sub>0</sub>; considera-se número de micro-organismos inoculados o recuperado de cada teste controle. No autoclavado obtinha-se o N, número de sobreviventes ao tratamento. A fração de inativação seguiu baseada na Lei de Arrhenius com integração numérica feita pelo método de Simpson e critério de mínimos quadrados (LEVENSPIEL, 1999):

$$x(\%) = \frac{(N_0 - N)}{N_0} \cdot 100 \quad \text{equação (2).}$$

Na recuperação dos endósporos foi adicionado 1 L de solução salina a 0,9% estéril dentro do saco, seguido de leve agitação para enxágue do material, e era perfurado e todo o líquido coletado em frasco estéril. O sistema de filtração era acionado pela bomba de vácuo e os micro-organismos presentes na solução eram retidos em membrana que era retirada cuidadosamente com uma pinça estéril e colocada dentro de um tubo “Falcon”. A Figura 3 ilustra os materiais utilizados nessa etapa.



Figura 3: Materiais e sistema de filtração utilizados na recuperação dos endósporos. Fonte: Autores.

Com 1 mL de TSB era feita a lavagem da membrana dentro do tubo e o líquido semeado em placa de Petri juntamente com 20 mL de TSA. Após 24 horas de incubação da placa a 57°C era feita a contagem das UFC por “pour plate”. A segunda amostra era retirada da autoclave e imediatamente colocada dentro da cabina e o processo acima descrito era igualmente repetido.

#### • Testes com reprodução dos micro-organismos após tratamento

A última etapa constituiu da verificação da possível reprodução dos micro-organismos mesmo após o tratamento por autoclave. Foram realizados três testes em triplicatas. Eram três condições de tempo de exposição à temperatura ambiente: 24 horas, 48 horas e 5 dias. Todo o processo de inoculação, autoclavagem, recuperação e contagem eram repetidos. A amostra do teste autoclavado foi armazenada em sacos para autoclave frouxamente lacrados e identificados.

## RESULTADOS

### • Estudo da influência da fração volumétrica ocupada na câmara de autoclavagem

Esperava-se que a fração ocupada dos resíduos na autoclave poderia ser um fator de influência no tratamento e que se houvesse variação de temperatura poderia ter região que não alcançasse a inativação desejada. Contudo, foram feitos testes com 1/3 e 2/3 de ocupação para observação de ocorrências na variação de temperatura entre os termopares com relação ao preenchimento do espaço da câmara. Ambas as amostras foram submetidas a 134°C por 10 min.

Contatou-se pequenas variações quando comparado um termopar com outro, de até 3°C, mais essas não foram influenciadas nem pela presença ou ausência de resíduo dentro do equipamento (foram feitos testes com o equipamento vazio). A fração de ocupação não foi um fator delimitante para a inativação de endósporos, pois a temperatura se manteve a mesma independentemente da quantidade de resíduo submetido à autoclavagem.

### • Resultados e avaliação das frações de inativação

A partir dos testes realizados constatou-se que a inativação dos endósporos atingiu 100% no tempo de 30 minutos de exposição à temperatura máxima de 134°C e pressão absoluta de 2,3 kgf/cm<sup>2</sup>. Sob cada condição, determinaram-se as frações de inativação microbiana conforme a equação 2. Foi objetivado trabalhar com 100% de inativação, pois somente assim seria possível garantir a esterilização do resíduo. O Gráfico 1 apresenta um comparativo dos indicadores de inativação.

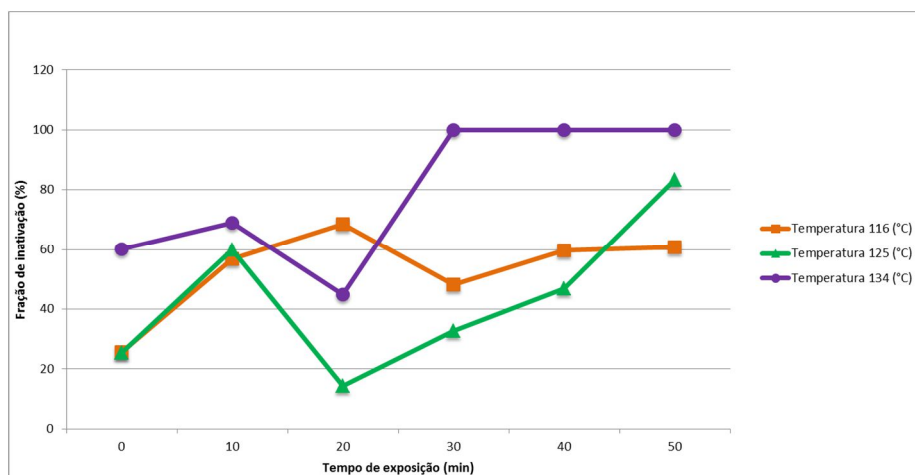


Gráfico 1: Comparativos dos indicadores das frações de inativação nas condições estudadas. Fonte: Autores.

Analisando, observou-se que até os 30 minutos de exposição houve variações na fração nas três condições. Em 125°C e 134°C o aumento na inativação consolidou-se aos 20 min. Sabendo-se que *G. stearothermophilus* é uma bactéria termofílica que cresce por volta de 60°C e que as UFC na forma de endósporos são mais resistentes, aponta-se a hipótese que antes desses tempos essa variação aconteceu porque ainda estavam se reproduzindo, buscando por sobrevivência.

### • A reprodução das *G. stearothermophilus* após tratamento

Baseado em Hossain *et al.* (2012), que constataram o crescimento de bactérias dois dias após autoclavagem, pois algumas das bactérias sobreviventes voltaram a se reproduzir mesmo após a exposição ao calor úmido, realizou-se testes para comprovação da condição otimizada para inativação microbiana.

Observou-se tal comportamento com 24 horas, 48 horas e 5 dias, na condição ideal de inativação de 134°C à 30 min de exposição. Os ensaios de recuperação foram feitos decorridos tais tempos utilizando os mesmos métodos de filtração, plaqueamento e contagem. A inativação nas condições otimizadas encontradas esteriliza o resíduo, pois que uma vez que alcançou índices de 100% em todas as situações, nenhum micro-organismo voltaria a se reproduzir. Esses resultados contrapõem o que preconiza também a Anvisa RDC nº 222/2018, que estabelece o Nível III de inativação 99,99% como o ideal. Em Anvisa (2006), a autoclavagem é definida como tratamento térmico para desinfecção dos RSS. Com essa pesquisa foi possível confirmar que se existir 0,01% de bactéria sobrevivente tem-se chance de reprodução, e multiplicados esses seres, aumenta o fator de risco de contaminação em áreas de aterros sanitários.



## CONCLUSÕES

Certificou-se da necessidade de se otimizar o processo de tratamento dos RSS por autoclave, constatada a falta de condições pré-estabelecidas e por ser a tecnologia mais utilizada para tratamento de resíduos infectantes quando comparada com micro-ondas. À temperatura de 134°C, a 2,3 kgf/cm<sup>2</sup> e 30 min de tempo de exposição a fração de inativação atingiu 100%. Tal alcance colaborou para eliminar incertezas. Se é possível a esterilização, a desinfecção apenas passa a ser inapropriada.

Não houve influência da fração volumétrica de ocupação da câmara sob variação de temperatura e consequente inativação microbiana, constatada através dos termopares, que alcançavam superfície e interior da massa de resíduos. Os ensaios com reprodução dos micro-organismos mesmo após tratamento, em dias de exposição à temperatura ambiente, comprovaram que em condição ideal para esterilização esses bioindicadores não se multiplicam, e o rejeito não oferece riscos de contaminação quando disposto.

Este estudo pode significar um grande avanço nas próprias unidades de tratamento, que terão um parâmetro estabelecido para trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 222, de 28 de Março de 2018 DOU de 29/03/2018. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Brasília, DF.
2. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 7 de Dezembro de 2004 DOU de 10/12/2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília, DF.
3. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Saúde. **Manual de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Tecnologia em Serviços de Saúde**. Brasília, 2006. 185 p.
4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10004**: Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 71 p.
5. \_\_\_\_\_. **ABNT NBR 10007**: Amostragem de resíduos sólidos. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 21 p.
6. BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, DF.
7. CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Norma Técnica L5.201, de Janeiro de 2006. Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio. São Paulo, SP.
8. \_\_\_\_\_. Norma Técnica E15.010, de Outubro de 2011. Sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente: procedimento. São Paulo, SP.
9. \_\_\_\_\_. Norma Técnica P2.112, de Novembro de 2016. Avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente: teste de inativação microbiana utilizando esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus* como bioindicadores. São Paulo, SP.
10. DE VOS, P. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. v. 3. Athens: Springer, 2009.
11. HOSSAIN, S. *et al.* Treatment of clinical solid waste using a steam autoclave as a possible alternative technology to incineration. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Basel, p. 855 – 867, 2012.
12. LEVENSPIEL, O. **Chemical Reactor Engineering**. 3. ed. John Wiley and Sons, New York, USA. 1999.
13. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Autoclavação como forma eficaz de inativação de micro-organismos em bolsas de sangue soropositivo**. Brasília, 2010. 106 p. il.
14. OLIVEIRA, A. B. R. **Proposta metodológica e avaliação da inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* no tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde por autoclavagem**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
15. OLIVEIRA, E. A. *et al.* Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste. **Waste Management**. v. 30, p. 2327 - 2335, 2010.