

**AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE ENDÓSPOROS DE GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS NO TRATAMENTO PRÉVIO DE RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE POR AUTOCLAVAGEM À 121°C**

**Amanda Borges Ribeiro de Oliveira (\*), Taís Maria Bauab, 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. Diante da ausência de informações na literatura que comprovassem a esterilização de RSS durante o tratamento à temperatura de 121°C prévio a destinação final (intraestabelecimento), 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 à 121°C observando a fração de inativação em dois tempos de exposição, 50 e 60 minutos. 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. As frações de 76% e 92% de inativação para as situações de 50 e 60 minutos respectivamente, representaram a ineficiência do tratamento nessa temperatura e pressão absoluta de 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>. O resultado dessas frações foi obtido através da relação do número de micro-organismos recuperados considerados como inoculados e o número de micro-organismos sobreviventes ao tratamento. Com os resultados alcançados foi possível concluir que à 121°C os resíduos não são esterilizados. As frações de inativação encontradas na presente pesquisa não foram satisfatórias nas condições mais utilizadas para esterilização de materiais e de resíduos submetidos a tratamento prévio em estabelecimentos de saúde.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resíduos de Serviços de Saúde, autoclavagem, tratamento prévio, esterilização, estabelecimentos de saúde.

**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. Towards the absence of information in the literature to prove the sterilization of healthcare waste during prior treatment to final destination (within the health facility) at a temperature of 121°C, the objective of this research was defined to optimize the process. 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 121°C observing the inactivation fraction in two exposure times, 50 and 60 minutes. 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 fractions of 76% and 92% for situations of 50 and 60 minutes respectively, represented the inefficiency of the treatment at this temperature and an absolute pressure of 1.3 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. With the results achieved it was possible to conclude that at 121°C the waste are not sterilized. The inactivation fractions found in the current study were not satisfactory in the most used conditions for sterilizing materials and waste that are subjected to prior treatment in health facilities.

**KEY WORDS:** Healthcare waste, autoclaving, prior treatment, sterilization, health facilities.



## INTRODUÇÃO

Os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS), quando caracterizado como perigoso, devem receber tratamento segundo a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) RDC nº 222/2018. Esse tratamento consiste na aplicação de processo que modifique as características físicas, químicas ou biológicas dos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de dano ao meio ambiente ou à saúde pública, e pode ser prévio ao armazenamento intraestabelecimento e/ou à disposição final em aterro sanitário, conforme 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 A1 e A2) e E, segundo a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) RDC nº 222/2018, sendo necessário que se atinja pelo menos o Nível III de inativação microbiana.

A mesma resolução pontua alguns RSS que necessitam do tratamento prévio à destinação final, ou seja, aquele que acontece dentro da unidade de saúde geradora o qual antecede o armazenamento temporário no abrigo de resíduos, com o intuito de evitar o risco à saúde do trabalhador. Resíduos do Subgrupo A1 como culturas e estoques de micro-organismos, os meios de cultura e os instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas contendo micro-organismos das classes de risco 1, 2, 3 e 4, necessitam desse tratamento prévio. Os RSS resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais com suspeita ou certeza de contaminação biológica por agentes classe de risco 4, podem ser tratados dentro ou fora da unidade geradora, assim como as bolsas de sangue e de hemocomponentes rejeitadas por contaminação, má conservação, prazo de validade vencido e oriundas de coleta incompleta, sobras de amostras de laboratório, recipientes e materiais contendo sangue ou líquidos corpóreos (Anvisa RDC nº 222/2018). Por fim, alguns RSS do Subgrupo A2 contendo micro-organismos com alto risco de transmissibilidade, alto potencial de letalidade ou com risco de contaminação ambiental, obrigatoriamente devem ser submetidos ao tratamento no local onde foi gerado.

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 metodologia empregada para os testes, 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, sendo que não há contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após o teste.

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. Galvão (2012) utilizou RSS do Subgrupo A1 gerados em laboratórios de microbiologia e seus resultados evidenciaram ineficiência na descontaminação dos resíduos à 121°C na autoclave.

Contudo, não foram encontrados trabalhos científicos que comprovassem a eficiência da esterilização em nenhuma das circunstâncias de tratamento prévio à destinação final de RSS, ou tratamento prévio à disposição em aterro sanitário, e até mesmo na esterilização de materiais e equipamentos utilizados nos serviços de saúde à temperatura de 121°C.

Com isso, nesta pesquisa, foram realizados ensaios para descobrir se a condição de 121°C seria favorável à inativação dos endósporos, já que é padronizada em hospitais, laboratórios de análises clínicas, laboratórios de ensino e pesquisa, consultórios odontológicos e outros estabelecimentos como temperatura ideal para esterilização de materiais e tratamento



prévio de RSS. Destaca-se, que segundo o Ministério da Saúde (2010), bolsas de sangue devem ser esterilizadas a 121°C e tempo de exposição de 50 minutos.

Uma vez comprovada a resistência de micro-organismos em amostras de RSS típico submetidos à autoclavagem, a proposição do presente estudo consistiu em avaliar tecnicamente a inativação de endósporos de *Geobacillus stearothermophilus* em RSS, sob as condições operacionais de tratamento prévio de RSS semelhantes a equipamentos em escala real. Apesar de ser a tecnologia mais utilizada para tratamento de resíduos infectantes, o processo de tratamento por autoclave pode ser otimizado nas unidades de saúde, para atender maiores eficiências na inativação microbiana, eliminando o risco à saúde e contaminação ambiental.

## OBJETIVOS

Avaliar tecnicamente a eficiência do processo de tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) por autoclave para que a inativação microbiana seja atingida mediante a condição de temperatura de 121°C, temperatura pré-estabelecida como ideal para esterilização de materiais em estabelecimentos de saúde e desinfecção de resíduos como forma de tratamento prévio à destinação final.

### • Objetivos Específicos

Analisar previamente estudos realizados com inativação microbiana à 121°C e quantificar os níveis de inativação microbiana no tratamento por autoclave, em função da condição operacional nessa temperatura e nos tempos de exposição de 50 e 60 minutos.

## METODOLOGIA

Esta pesquisa foi desenvolvida com base na proposta metodológica de Oliveira (2017) estruturada para avaliar o tratamento extraestabelecimento 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 A1, A2 e A4, pois os subgrupos A3 e A5 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 externo por autoclave, 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 quarteramento (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.

Para que não houvesse extrapolação 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 fracos 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 1 a) exibe a ocupação de 1/3 do volume total da autoclave e a localização dos termopares instalados, e a b) é referente as instalações dos equipamentos.

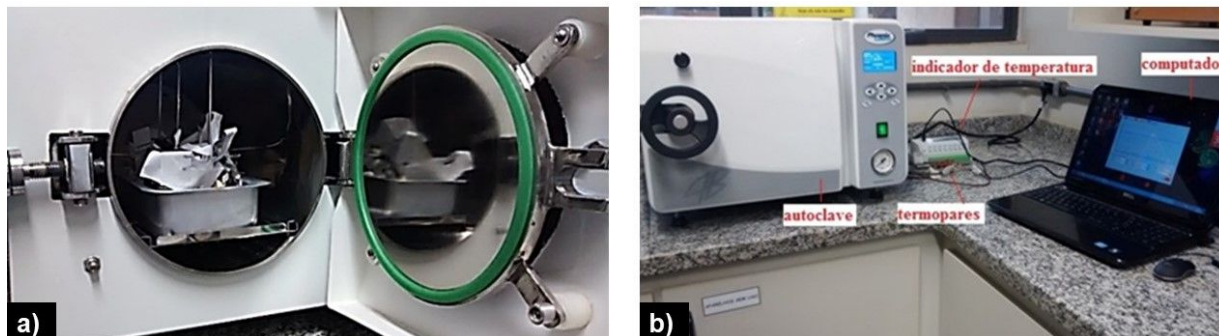


Figura 1: a) Volume de 1/3 de ocupação da câmara da autoclave e posicionamento dos termopares; b) Equipamentos devidamente instalados para os testes com autoclavagem. Fonte: Autores.

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  $\mu$ L de solução salina para inoculação. Após 24 horas de incubação a  $57^\circ\text{C}$ , 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 UFC. Dentro da cabina de segurança inoculava-se 1 mL da suspensão diluída de  $10^6$  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 2 ensaios com autoclavagem de RSS para observar através de gráficos o resultado dessa fração sob a temperatura de  $121^\circ\text{C}$ , pressão absoluta  $1,3 \text{ kgf/cm}^2$  e tempos de exposição de 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  $N_0$ ; 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 2 ilustra os materiais utilizados nessa etapa.



Figura 2: 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.

## RESULTADOS

### • Outras pesquisas desenvolvidas com inativação microbiana à 121°C

Em Hossain *et al.* (2012), constataram que com o aumento do tempo e da temperatura o número de micro-organismos patogênicos diminuiu, porém, a autoclavagem de RSS não foi efetiva no sentido de atingir o Nível III de inativação microbiana recomendado por Anvisa RDC nº 222/2018. As condições ótimas experimentais para o grau de inativação das células vegetativas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis* eram de 121°C durante 15 minutos para as bactérias gram-negativas, e de 121°C a 131°C, durante 60 e 30 minutos para as gram-positivas. O “recrescimento” foi constatado em células vegetativas, sendo que seria mais favorecida a observação em endósporos.

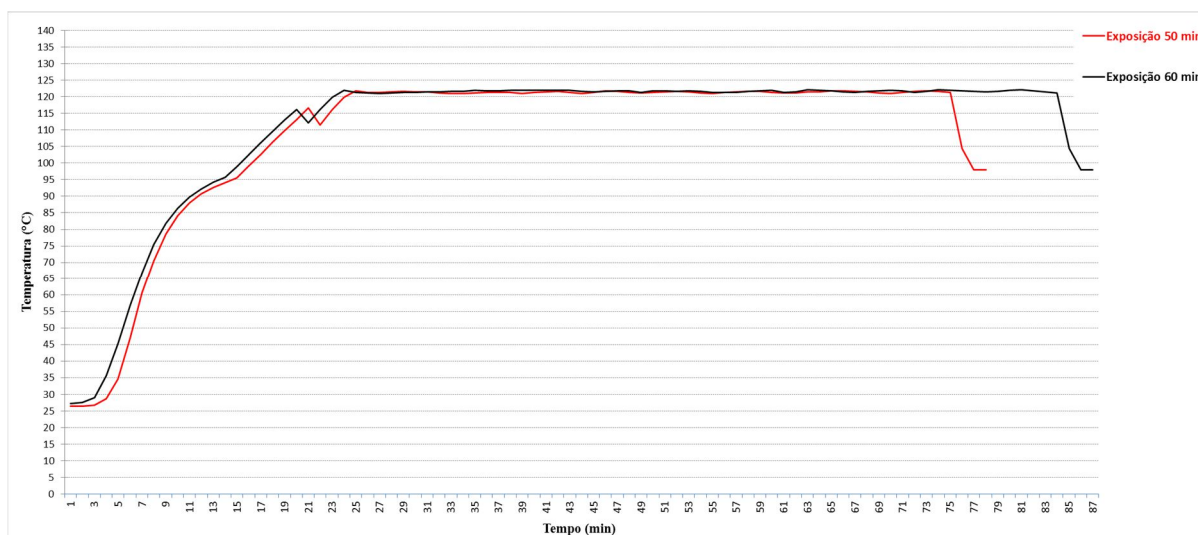
Com isso, nesta pesquisa, foram realizados ensaios para descobrir se a condição de temperatura de 121°C seria favorável à inativação dos endósporos, já que é padronizada em hospitais, laboratórios de análises clínicas, laboratórios de ensino e pesquisa, consultórios odontológicos e outros estabelecimentos a temperatura ideal para esterilização de materiais e tratamento prévio de RSS a temperatura de 121°C, apesar de não terem sido encontrados trabalhos científicos que comprovem a eficiência da esterilização nessa circunstância. Destaca-se, que segundo o Ministério da Saúde (2010), bolsas de sangue são esterilizadas a 121°C e tempo de exposição de 50 minutos. Após testes com inativação microbiana em bolsas de sangue, afirmou que os endósporos de *G. stearothermophilus* são mais resistentes ao calor úmido de um ciclo de inativação do que os vírus da Hepatite B.

Galvão (2012) utilizou RSS do Subgrupo A1 gerados em laboratórios de microbiologia. Não realizou contagem de micro-organismos sobreviventes ao processo de tratamento, apenas indicador biológico de presença ou ausência de endósporos de *G. stearothermophilus*. Os resultados evidenciaram ineficiência na descontaminação dos resíduos à 121°C na autoclave. Não foram detalhadas condições de tempo de exposição pelo autor.

### • Resultados e avaliação das frações de inativação

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. 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). O Gráfico 1 apresenta os testes feitos sob 121°C e tempos de exposição de 50 e 60 min.



**Gráfico 1: Variação do tempo de exposição na temperatura de 121°C nos dois testes realizados. Fonte: Autores.**

Para cada condição de exposição atingida dentro da câmara da autoclave, determinaram-se as frações de inativação microbiana conforme a equação 2. A Tabela 1 descreve as condições, a relação do número de micro-organismos inoculados perante os sobreviventes, resultando na fração de inativação.

**Tabela 1. Fração de inativação alcançada para cada condição estabelecida. Fonte: Autores.**

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)	Pressão máxima atingida (kgf/cm <sup>2</sup> )	N <sub>inoculados</sub> (N <sub>0</sub> )	N <sub>final</sub> (N)	Fração de inativação (%)
121	50	1,3	2,32 x 10 <sup>5</sup>	5,50 x 10 <sup>4</sup>	76,29
121	60	1,3	6,16 x 10 <sup>5</sup>	4,20 x 10 <sup>4</sup>	92,47

O tempo de exposição refere-se ao tempo de contato que a amostra ficou exposta apenas à temperatura máxima. As frações de 76 e 92% de inativação para essas situações representou a ineficiência do tratamento nessa temperatura e pressão absoluta de 1,3 kgf/cm<sup>2</sup> (atingida pelo equipamento utilizado neste estudo).

## CONCLUSÕES

O objetivo de autoclavar o resíduo a 121°C foi para verificar se a fração de inativação seria satisfatória nas condições mais utilizadas para esterilização de materiais e RSS do Subgrupo A1 em estabelecimentos de saúde. Por isso os testes foram feitos apenas com tempos de contato maiores (50 e 60 minutos).

As frações de inativação para as situações estudadas representaram a ineficiência do tratamento. Não foram encontrados trabalhos científicos que comprovem a eficiência da esterilização nessa circunstância, apesar do Ministério da Saúde (2010) preconizar essa condição (121°C à 50 minutos) como ideal para esterilização de bolsas de sangue. Em Hossain *et al.* (2012) as bactérias voltaram a se reproduzir após autoclavagem e suposta inativação. Ressalta-se que *G. stearothermophilus* é gram-positiva e a presente pesquisa trabalhou com endósporos, que são mais resistentes. Acredita-se que para cada contaminante têm-se a condição específica favorável à inativação.

Com os resultados alcançados nessa pesquisa, foi possível concluir que nessa temperatura os resíduos não são esterilizados e também não atingem o Nível III de inativação (99,99%) preconizado por legislação como ideal para desinfecção de RSS. As frações de inativação encontradas não foram satisfatórias nas condições mais utilizadas para esterilização de materiais e de resíduos submetidos a tratamento prévio em estabelecimentos de saúde.



## 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. CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 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.
7. \_\_\_\_\_. 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.
8. GALVÃO, M. A. **Avaliação da eficácia da descontaminação de resíduos biológicos do subgrupo A1 por tratamento térmico em autoclave a vapor: um estudo de caso**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.
9. 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.
10. LEVENSPIEL, O. **Chemical Reactor Engineering**. 3. ed. John Wiley and Sons, New York, USA. 1999.
11. 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.
12. 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.
13. OLIVEIRA, E. A. *et al.* Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste. **Waste Management**. v. 30, p. 2327 - 2335, 2010