UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

RACHEL MACIEL MONTEIRO

**Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica:
uma proposta de intervenção**

RIBEIRÃO PRETO
2018

RACHEL MACIEL MONTEIRO

**Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica:
uma proposta de intervenção**

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Fundamentação teórica, metodológica e tecnológica do processo de cuidar.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Monteiro, Rachel Maciel

Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica: uma proposta de intervenção.

Ribeirão Preto, 2018.

76 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Evandro Watanabe

1. Biofilmes. 2. Controle da Contaminação da Água. 3. Desinfecção.
4. Linha d'água de Equipo Odontológico. 5. Microbiologia da Água.

MONTEIRO, Rachel Maciel.

Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica: uma proposta de intervenção

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Aprovado em: / /

Comissão Julgadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zenaide Nicolino Maciel e Ademar Passini Monteiro, que dignamente apresentaram a mim a importância da família, do caminho da honestidade, persistência e valores reais da vida. Obrigada por todo amor, dedicação em todos os momentos e por acreditarem em mim, sem medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre iluminou meu caminho e minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe, que desde início acreditou em mim. O meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que exala sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade e pelo seu dom no ensino da ciência.

À Prof. Dra. Denise de Andrade, pela amizade, pelos ensinamentos transferidos e por me acolher na família do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP.

À Prof. Dra. Ana Maria Razaboni, que participou da minha banca do exame de qualificação de mestrado e realizou ótimas sugestões para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem Fundamental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Ao Projeto de Pesquisa Regular. Auxílio à Pesquisa da FAPESP (Processo no 13/02984-8). Biossegurança: manutenção do ambiente odontológico biologicamente seguro. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Departamento de Odontologia Restauradora. Pesquisador responsável / Beneficiário: Prof. Dr. Evandro Watanabe.

À Marcela Padilha Facetto Azevedo, por ser sempre minha companheira de pesquisa, ideias e projetos. Obrigada por essa amizade maravilhosa que conquistamos. Ainda, obrigada por compartilhar os momentos de alegria da Juju.

À Viviane de Cássia Oliveira, por seu profissionalismo, auxílio prestado na análise microbiológica, cada ensinamento e amizade.

Aos membros do NEPECISS pelo convívio que construímos dentro e fora do laboratório, obrigada por cada risada, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

Aos meus amigos de laboratório, Álvaro Francisco Lopes de Sousa, Artur Acelino Francisco Luz Queiroz, Daniella Maia Marques, Felipe Lazarini Bim, Gisele Tais Roldão de Souza, Lucas Lazarini Bim, Marinila Buzanelo Machado, Pedro Castania Amadio Domingues, por cada experiência adquirida e pesquisa realizada. Sem vocês seria difícil seguir essa jornada.

Aos meus irmãos, Guilherme Maciel Sapia e Fernanda Maciel Sapia, por terem dividido as alegrias da minha infância e sempre estarem torcendo por mim. Amor incondicional, sempre. A distância não nos separa. Seus corações estão comigo e o meu com vocês.

Às minhas irmãs, Giuliana das Neves Monteiro Mourão, Luciana das Neves Monteiro e Alessandra das Neves Monteiro, que mesmo distantes fisicamente, sempre estivemos próximas no amor.

Aos meus sobrinhos, Wilton Mourão Filho, Ana Beatriz Monteiro Franzini, Giovanni Monteiro Franzini, Bruno Monteiro Franzini; Manuela Sapia Müller e Isabel Pereira Sapia, por trazerem a alegria e a luz para minha vida.

Ao Maciel Graziani Danna Bueno, pessoa que compartilho minhas alegrias e aflições. Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

À minha amiga de longa data Jacqueline Jordan Guedes, que mesmo morando longe nossa amizade continua forte.

À minha família, que sempre me apoiou e confiou em mim.

Às minhas eternas amigas, “Poucas e Boas” Barbara Dall Pizzol Nagata, Leticia Baby Couto, Livia Sanches Toledo, Maíra Sertorio Maia, Marília de Paiva Camargo e Thalyta Coelho de Oliveira, porque o que Bandeirantes - PR uniu nada nesse mundo separa.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada segundo.

RESUMO

MONTEIRO, R. M. **Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica**: uma proposta de intervenção. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Na odontologia, o biofilme formado nas linhas d'água de equipamentos odontológicos pode disseminar a contaminação microbiana na água. O objetivo desta pesquisa foi investigar a contaminação microbiana da água de abastecimento e de equipamentos odontológicos antes e após a implementação de um protocolo para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água de equipamentos odontológicos, bem como desenvolver produtos antibiofilme com possível aplicabilidade nas linhas d'água. A carga microbiana da água de 27 torneiras e equipamentos (reservatórios, seringas triplice e alta rotação) de uma clínica odontológica foi avaliada por meio do sistema *Petrifilm*TM (bactérias aeróbias totais e fungos) e meios de cultura convencionais (enterobactérias e *Legionella* spp.) em duas etapas distintas, sendo a segunda análise realizada após a implementação de um protocolo para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água dos equipamentos. Ainda, as atividades antibacteriana (concentração inibitória mínima – hipoclorito de sódio, ácido cítrico, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio, peróxido de hidrogênio, polissorbato 20 e quitosana) e antibiofilme (biomassa total e viabilidade celular) foram determinadas *in vitro* a partir de substâncias e produtos com possível aplicabilidade na desinfecção de linhas d'água de equipamentos. As amostras de água das torneiras apresentaram carga bacteriana dentro do parâmetro estabelecido pela legislação brasileira, no entanto, as seringas triplices e os alta rotação não. A implementação do protocolo para manutenção da qualidade microbiológica da água dos equipamentos demonstrou uma redução nas cargas bacteriana e fúngica apenas nos alta rotação. Enterobactérias e *Legionella* spp. não foram isoladas das amostras de água das torneiras e dos equipamentos. De acordo com a concentração inibitória mínima, o ácido cítrico, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio demonstraram as melhores atividades antibacterianas. As melhores atividades antibiofilme (biomassa total) foram do peróxido de hidrogênio a 5% (*E. coli* e *P. aeruginosa*), ácido cítrico a 30% (*P. aeruginosa*) e bicarbonato de sódio a 30% (*S. aureus*). Os produtos (*Wanitox A* e *Wanitox B*) desenvolvidos apresentaram atividade antibiofilme (viabilidade celular) contra a *E. coli* e *S. aureus*. Assim, os produtos desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram possível aplicabilidade no enfrentamento do biofilme nas linhas d'água de equipamentos odontológicos, que permanece como um dos grandes desafios na odontologia. Ainda, pesquisas adicionais são necessárias para o aperfeiçoamento e aplicabilidade destes produtos.

Palavras-chave: Biofilmes. Controle da Contaminação da Água. Desinfecção. Linha d'água de Equipamento Odontológico. Microbiologia da Água.

ABSTRACT

MONTEIRO, R. M. **Water quality in a dental clinic in the microbiological perspective**: a proposal of intervention. 2018. 75 f. Dissertation (Master in Science) - School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

In dentistry, biofilm formed on dental unit waterlines can disseminate microbial contamination in water. The objective of this research was to determine the microbial contamination of water from supplies and dental units before and after the implementation of a protocol for improvement and maintenance of microbiological water quality of water from dental units as well as to develop antibiofilm products with possible applicability in waterlines. The microbial load of water from 27 taps and dental units (reservoirs, air-water syringes and high-speed turbines) in a dental clinic was evaluated through a *Petriefilm*TM system (total aerobic bacteria and fungi) and conventional culture mediums (enterobacteria and *Legionella* spp.) in two distinct stages, being the second analysis performed after the implementation of a protocol for improvement and maintenance of microbiological water quality of water from dental units. Moreover, the antibacterial (minimum inhibitory concentration – sodium hypochlorite, citric acid, sodium bicarbonate, sodium chloride, sodium dodecyl sulfate, hydrogen peroxide, polysorbate 20 and chitosan) and antibiofilm (total biomass and cell viability) activities were determined *in vitro* from substances and products with possible applicability in disinfection of dental unit waterlines. The water samples from taps presented bacterial load within the parameter established by Brazilian legislation; however, air-water syringes and high-speed turbines did not. The protocol implementation for maintenance of microbiological water quality of water from dental units showed a decrease on bacterial and fungal loads only on high-speed turbines. Enterobacteria and *Legionella* spp. were not isolated from water samples from taps and dental units. According to minimum inhibitory concentration, citric acid, sodium bicarbonate, sodium chloride, sodium hypochlorite and hydrogen peroxide showed the best antibacterial activities. The best antibiofilm activities (total biomass) were from 5% hydrogen peroxide (*E. coli* and *P. aeruginosa*), 30% citric acid (*P. aeruginosa*) and 30% sodium bicarbonate (*S. aureus*). The developed products (*Wanitox A* and *Wanitox B*) showed antibiofilm activity (cell viability) against *E. coli* and *S. aureus*. Thus, the products developed in this research presented a possible applicability in confrontation with biofilm on dental unit waterlines, and this remains as a major challenge in dentistry. Besides, additional researches are necessary for enhancement and applicability of these products.

Keywords: Biofilms. Water Contamination Control. Disinfection. Dental Unit Waterlines. Water Microbiology.

RESUMEN

MONTEIRO, R. M. **Calidad del agua en clínica odontológica desde la perspectiva microbiológica:** una propuesta de intervención. 2018. 75 h. Disertación (Maestría en Ciencias) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

En odontología, la biopelícula formada en las líneas de agua de equipos odontológicos puede difundir la contaminación microbiana en el agua. Esta investigación tuvo como objetivo examinar la contaminación microbiana del agua de abastecimiento y de equipos odontológicos antes y después de la implementación de un protocolo para la mejora y mantenimiento de la calidad microbiológica del agua de equipos odontológicos, así como desarrollar productos antibiopelículas con posible aplicabilidad en las líneas de agua. La carga microbiana del agua de 27 grifos y equipos (depósitos, jeringas triples y bolígrafos para alta rotación) de una clínica odontológica fue evaluada por medio del sistema *Petrifilm*TM (bacterias aerobias totales y hongos) y medios de cultivo convencionales (enterobacterias y *Legionella* spp.) en dos etapas diferentes, donde el segundo análisis se realizó después de la implementación de un protocolo para la mejora y mantenimiento de la calidad microbiológica del agua de los equipos. Además, las actividades antibacteriana (concentración inhibitoria mínima – hipoclorito de sodio, ácido cítrico, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, dodecil sulfato de sodio, peróxido de hidrógeno, polisorbato 20 y quitosana) y antibiopelícula (biomasa total y viabilidad celular) se determinaron *in vitro* a partir de sustancias y productos con posible aplicabilidad en la desinfección de líneas de agua de equipos. Las muestras de agua de los grifos presentaron carga bacteriana dentro del parámetro establecido por la legislación brasileña, pero las jeringas triples y los bolígrafos para alta rotación no presentaron. La implementación del protocolo para el mantenimiento de la calidad microbiológica del agua de los equipos demostró una reducción en las cargas bacteriana y fúngica solo en los bolígrafos para alta rotación. Enterobacterias y *Legionella* spp. no fueron aisladas de las muestras de agua de los grifos y de los equipos. De acuerdo con la concentración inhibitoria mínima, el ácido cítrico, el bicarbonato de sodio, el cloruro de sodio, el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno demostraron las mejores actividades antibacteriana. Las mejores actividades antibiopelícula (biomasa total) fueron del peróxido de hidrógeno al 5% (*E. coli* y *P. aeruginosa*), del ácido cítrico al 30% (*P. aeruginosa*) y del bicarbonato de sodio al 30% (*S. aureus*). Los productos (*Wanitox A* y *Wanitox B*) desarrollados presentaron actividad antibiopelícula (viabilidad celular) contra *E. coli* y *S. aureus*. Así, los productos desarrollados en esta investigación presentaron posible aplicabilidad en el enfrentamiento de la biopelícula en las líneas de agua de equipos odontológicos, lo que todavía perdura como uno de los grandes retos en el área de odontología. Además, se hacen necesarias investigaciones adicionales para el perfeccionamiento y aplicabilidad de dichos productos.

Palabras clave: Biopelículas. Control de la Contaminación del Agua. Desinfección. Línea de agua de Equipo Odontológico. Microbiología del Agua.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISTA DA LITERATURA.....	15
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Local de estudo.....	33
4.2 Procedimento ético em pesquisa.....	33
4.3 Avaliação da carga microbiana da água de torneiras e equipos odontológicos.....	33
4.4 Atividades antibacteriana e antibiofilme <i>in vitro</i> em linhas d'água de equipos odontológicos.....	36
4.4.1 Atividade antibacteriana: concentração inibitória mínima.....	36
4.4.2 Atividade antibiofilme: biomassa total.....	37
4.5 Desenvolvimento e avaliação <i>in vitro</i> de produtos antibiofilmes com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos.....	37
4.5.1 Atividade antibiofilme: Viabilidade Celular.....	38
4.6 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Avaliação da carga microbiana da água de torneiras e equipos odontológicos.....	40
5.2 Determinação das atividades antibacteriana e antibiofilme <i>in vitro</i> de substâncias e produtos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos.....	45
5.2.1 Atividade antibacteriana: concentração inibitória mínima.....	45
5.2.2 Atividade antibiofilme: biomassa total.....	45
5.3 Desenvolvimento e avaliação <i>in vitro</i> de produtos antibiofilmes com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos.....	48
5.3.1 Atividade antibiofilme: Viabilidade Celular.....	48
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	60

REFERÊNCIAS..... 62

APÊNDICES..... 68

1 INTRODUÇÃO

O cuidado em saúde é constantemente desafiado por infecções, que resultam na mobilização de pesquisadores, de órgãos e associações, na tentativa de prevenir e controlar a sua ocorrência.

Na odontologia, durante o último século, o equipo odontológico evoluiu do modelo original constituído de polia movido a pedal para os atuais, com tecnologia capaz de conferir segurança e redução do risco biológico. A maior transformação ocorreu no início dos anos 50, com o surgimento das seringas tríplexes e dos alta rotação.

Os equipamentos giratórios/rotatórios de alta velocidade exigem resfriamento à água para prevenir a injúria térmica. Esse problema foi contornado com a instalação de uma mangueira/tubulação longa, fina e flexível para canalização de água e ar aos alta rotação e às seringas tríplexes. Entretanto, os responsáveis pela sua origem e profissionais não imaginavam, que essas linhas d'água longas e delgadas poderiam abrigar um abundante número de micro-organismos provenientes da água, mesmo com a instituição dos princípios básicos de assepsia (MILLS; KARPAY, 2002).

Naturalmente, a água que chega ao equipo contém carga microbiana reduzida, uma vez que é a mesma consumida pela população. No Brasil, de acordo com a portaria nº 518 do Ministério da Saúde, esse limite é de 500UFC/mL de água (BRASIL, 2004). Ainda, a *American Dental Association* (ADA), em 1996, recomendou que a água não apresentasse contaminação maior que 200UFC/mL.

Entretanto, a água dos equipos odontológicos pode representar risco à saúde bucal e geral dos indivíduos, em virtude da contaminação microbiana e formação de biofilme nas linhas d'água (WATANABE, 2007; BANSAL et al., 2011; LIN et al., 2011; O'DONNELL et al., 2011; PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011; LAL et al., 2015; SHAJAHAN et al., 2017). Destaca-se que os primeiros relatos da contaminação microbiana da água dos equipos odontológicos e da formação de biofilme nas linhas d'água foram de acordo com Blake (1963) e Kelstrup et al. (1977), respectivamente.

Biofilme é a (o) comunidade / consórcio / cadeia alimentar de micro-organismos aderidos na superfície de sólidos e embutidos em matriz de substâncias poliméricas extracelulares (açúcares, proteínas e ácidos nucleicos), em ambiente que contém líquidos, sendo altamente resistente aos agentes antimicrobianos (HALL-

STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Devido a essa problemática, autores mencionaram diferentes protocolos para desinfecção das linhas d'água dos equipos com substâncias e produtos comerciais, visando o controle da formação do biofilme (GAWANDE et al., 2008; PERCIVAL et al., 2009; ORRÙ et al., 2010; ABDALLAH e KHALIL 2011; BANSAL et al., 2011; LIN et al., 2011; O'DONNELL et al., 2011; PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011; ROSSI-FEDELE et al., 2011; KRAMER et al., 2012; PAREEK et al., 2013; AGAHI et al., 2014; BARBOT et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; BOWEN et al., 2015; HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015; LAL et al., 2015; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; COSTA et al., 2016a; DITOMMASO et al., 2016; LIZON et al., 2016; PAWAR et al., 2016; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017; SHAJAHAN et al., 2017).

Assim, pesquisas são necessárias para a compreensão de protocolos para melhoria da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos, bem como o desenvolvimento de produtos antibiofilmes com possível aplicabilidade nas linhas d'água, uma vez que ainda não há produto comercial aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para essa finalidade.

2 REVISTA DA LITERATURA

Esta revista da literatura foi desenvolvida a partir de uma busca sistematizada dos artigos científicos originais relacionados à desinfecção das linhas d'água de equipos odontológicos, que foram publicados no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* nos últimos 10 anos (janeiro de 2008 a março de 2018).

Gawande et al. (2008) avaliaram *in vitro* o efeito isolado e combinado de várias substâncias na formação e dispersão de biofilmes por bactérias e levedura associados às linhas d'água de equipos odontológicos. As substâncias isoladas e combinadas: bicarbonato de sódio (SB), metaperiodato de sódio (PMS) e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram avaliadas em placas de microdiluição de 96 poços contra *Pseudomonas aeruginosa* (PA01), *Staphylococcus aureus* (KB11), *Klebsiella pneumoniae* (P30) – *tryptic soy agar* e *and tryptic soy broth* – *Mycobacterium avium* (KB81), *Mycobacterium chelonae* (KB82), *Mycobacterium gordonae* (KB83), e *Legionella pneumophila* (ATCC 33733) – *Middlebrook 7H9 agar* e *yeast extract charcoal agar* – *Fusobacterium nucleatum* (KB50) – *Baird-Parker agar* e *calco mineral básico* – *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104) – *Columbia blood agar* e *TSBYK*. As substâncias combinadas: SB + SDS + PMS mostraram maior dispersão de biofilme do que as substâncias isoladas. Além disso, quando comparado com os produtos comerciais (*Oxygenal 6*, *Sterilex Ultra* e *PeraSafe*) que não apresentaram atividade antibiofilme, as substâncias combinadas reduziram 90% de *P. aeruginosa*. Então, o emprego combinado das substâncias SB, PMS e SDS demonstrou atividade antibiofilme contra bactérias e levedura, que podem ser isoladas das linhas d'água de equipos odontológicos.

Em 2009, O'Donnell et al. desenvolveram um sistema centralizado e automatizado para prover água potável de equipos odontológicos por um longo período e com o mínimo de intervenções humanas. Amostras de água do tanque de abastecimento de 103 equipos e de seringas tríplices foram avaliadas com relação à carga bacteriana após a desinfecção com *Ecasol* a 2,5ppm e ativação eletroquímica. As amostras de água foram coletadas e semeadas semanalmente por 100 semanas em *R2A agar* e incubadas de 20 a 22°C por 10 dias. A identificação bacteriana foi realizada pelo sequenciamento genético do 16S DNAr. Ainda, a análise da formação

de biofilme nas linhas d'água das seringas tríplice foi realizada com auxílio de microscópio eletrônico de varredura (MEV). A carga bacteriana da água do tanque de abastecimento sem e com desinfecção, bem como a das seringas tríplice foram de 88UFC/mL, <1UFC/mL e 18,1UFC/mL, respectivamente. As bactérias identificadas foram *Arthropacter agilis*, *Kocuria palustres*, *Micrococcus luteus* e *Rhodococcus fascians*. Além disso, não houve evidência para a formação de biofilme nas linhas d'água dos equipos por MEV e efeitos corrosivos nos equipos. Em conclusão, o sistema centralizado e automatizado de desinfecção das linhas d'água dos equipos odontológicos manteve a potabilidade bacteriológica da água por um longo período.

Percival et al. (2009) determinaram a eficácia do *EDTA* no controle da contaminação microbiana das linhas d'água de equipos odontológicos. Coletas antes e durante a desinfecção dos equipos foram realizadas. As amostras foram filtradas através de membranas de 0,2µm (nitrato de celulose) para a detecção dos micro-organismos. Alíquotas (100µL) de amostras de água de diluições decimais seriadas foram semeadas em placas de Petri com: ágar de extrato de levedura e incubadas em aerobiose a 37°C por 72h (bactérias aeróbias totais); *Pseudomonas agar* (*Pseudomonas* spp.) e *MacConkey agar* (enterobactérias) incubadas em aerobiose a 37°C por até 48h. Um total de 10 equipos foram desinfetados semanalmente com *EDTA* a 4% ou 8% durante quatro ou duas semanas consecutivas, respectivamente. Antes da desinfecção, 43% das amostras de água das seringas tríplices e 60% dos alta rotação mostraram contaminação acima de 200UFC/mL durante seis semanas. Após cada desinfecção realizada nos finais de semana, os níveis de contaminação microbiana em todos os equipos reduziram para aquém de 200UFC/mL ($p < 0,001$). Os biofilmes das linhas d'água foram corados com *BacLight* durante 1h e a leitura das células bacterianas vivas e mortas determinada por microscópio confocal a laser. Como cepas controle para esta análise, *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 10332) e *Escherichia coli* (NCTC 11954) foram utilizadas. No final da semana, a carga microbiana na água retornou aos valores de antes da desinfecção, indicando um efeito transitório do *EDTA* e a necessidade de múltiplas desinfecções. Em conclusão, os biofilmes foram praticamente eliminados após uma única desinfecção com *EDTA* realizada no final de semana, e a contaminação microbiana controlada nas linhas d'água dos equinos odontológicos.

Porteous; Partida (2009) avaliaram o procedimento de desinfecção das linhas d'água de equipos odontológicos com dióxido de cloro. Três equipos foram empregados como teste e três como controles (sem desinfecção). Após quatro semanas da condução da pesquisa, os equipos teste e controle foram trocados de grupo. As amostras de água foram coletadas das linhas d'água dos equipos e das torneiras das pias após um *flush* de água de 20 a 30s com adição de tiosulfato de sódio, sendo que a frequência de uso de cada equipo foi registrada. As amostras foram diluídas e semeadas em *R2A agar* e incubadas à temperatura ambiente por 7 dias. Assim, nesta pesquisa não foi evidenciado dano nas linhas d'água dos equipos odontológicos com o aumento da frequência de uso e desinfecção com dióxido de cloro, mas houve redução da contaminação microbiana após a implementação do procedimento de desinfecção.

Orrù et al. (2010) avaliaram um equipo odontológico acoplado com um dispositivo projetado para desinfecção automática e contínua de peróxido de hidrogênio, bem como um sistema de desinfecção descontínuo (BIOSTER). Preliminarmente, a concentração inibitória mínima do peróxido de hidrogênio (100 a 800ppm) foi avaliada contra bactérias e fungos. Ainda, as linhas d'água dos equipos foram contaminadas com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 7075), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e as atividades antibacteriana e antibiofilme avaliadas após desinfecção com peróxido de hidrogênio a 3%. Além disso, a contagem do número de cópias do material genético microbiano (16S RNAr) por PCR em tempo real em diferentes locais das linhas d'água dos equipos foi avaliada. As atividades antibacterianas dos micro-organismos frequentemente relatadas em linhas d'água de equipos odontológicos (*Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*) e alguns patógenos periodontais foram de 100 a 300ppm (incluindo também o *Mycobacterium marinum* – Middlebrook 7H10 agar suplementado com OADC e incubação à temperatura ambiente por 2 a 4 semanas; e a *Candida albicans* – Sabouraud agar e incubação a 35°C por 48h). No entanto, o peróxido de hidrogênio não apresentou efeitos inibitórios contra: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (CCUG 37005), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Fusobacterium nucleatum* (DSMZ 19508), *Peptostreptococcus micros*. Em suma, o peróxido de hidrogênio

apresentou atividades antimicrobiana e antibiofilme contra micro-organismos presentes em linhas d'água de equipos odontológicos.

Abdallah; Khalil (2011) avaliaram a contaminação microbiana da água de equipos odontológicos antes e após serem submetidos a uma intervenção para a redução da contaminação bacteriana. As amostras de água foram coletadas, assepticamente, em frascos com tiosulfato de sódio a partir das linhas d'água dos equipos odontológicos para detecção de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os equipos foram abastecidos com água de torneiras de quatro clínicas dentárias submetidas ao processo e destilação. As intervenções realizadas nos equipos foram: cloração (pastilha de *Actichlor* – 5,0g / 250mL de água), *flush* de água no início e final do expediente de trabalho e entre o atendimento dos pacientes com água recém-destilada diariamente. Houve uma diferença entre a carga de contaminação bacteriana das canetas de alta rotação (1,5 a 2,7logUFC/mL) e água dos equipos (2,0 a 3,5logUFC/mL). Coliformes totais (0,9%), *Escherichia coli* (0,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (1,8%) foram detectados. Então, esta pesquisa indicou a necessidade de monitorar regularmente a qualidade microbiológica da água e evitar a estagnação de água nas linhas d'água de equipos odontológicos com o intuito de controlar a carga bacteriana da água (<100UFC/mL). Ademais, o *flush* de água é recomendado no início do atendimento do primeiro paciente (2min) e entre os pacientes (10 a 20s), bem como a cloração para o controle da formação de biofilme.

Bansal et al. (2011) avaliaram dois protocolos no controle de contaminação de linhas d'água de equipos odontológicos. Ambos os protocolos utilizaram pastilhas de dióxido de cloro a 50ppm para desinfecção de “choque”, inicialmente, com exposição periódica. Para o tratamento odontológico dos pacientes comparou-se o uso de água com dióxido de cloro a 3ppm e extrato botânico cítrico. Empregou-se a determinação da carga bacteriana e a análise por microscópio confocal de varredura a laser (*Baclight Green and Red*). As amostras de água foram coletadas, adicionadas de tiosulfato de sódio, diluídas, semeadas em placa de Petri com *R2A agar* e incubadas à temperatura ambiente por 7 dias. Desta maneira, os dois protocolos de desinfecção com pastilhas de dióxido de cloro a 50ppm reduziram a contaminação bacteriana da água dos equipos odontológicos para aquém de 500UFC/mL, bem como a presença de biofilme nas linhas d'água.

Lin et al. em 2011 estudaram os efeitos de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio contra biofilmes maduros e células planctônicas em um sistema simulado de linhas d'água de equipos odontológicos. Além disso, quatro sistemas simulados de linhas d'água de equipos foram utilizados durante 12 semanas e, inicialmente, limpos para avaliação do biofilme e depósitos inorgânicos. Peróxido de hidrogênio nas concentrações de 1%, 2% e 3% foi utilizado semanalmente para desinfecção periódica dos equipos: grupos teste (peróxido de hidrogênio a 0,05%, 0,15% e 0,25%) e grupo controle (água do sistema público municipal). A avaliação do biofilme foi determinada com o auxílio de microscópios confocal de varredura a laser e eletrônico de varredura. Ainda, a contagem das bactérias aeróbias heterotróficas totais foi realizada por meio de cultivo. A carga bacteriana das amostras de água dos equipos controle atingiu 400.000UFC/mL, enquanto todas as amostras dos equipos teste mostraram <500UFC/mL durante a maioria das 12 semanas. Ainda, todos os equipos teste mostraram diferentes níveis de biofilme e depósito inorgânico. A análise *in vitro* mostrou o controle do biofilme, entretanto não houve sua eliminação completa com a utilização de peróxido de hidrogênio a 7% após a exposição de 24h. Concluiu-se que o peróxido de hidrogênio a 2% e 0,05% controlou o biofilme e as células planctônicas dos equipos odontológicos segundo a recomendação do *Centers for Disease Control and Prevention* (<500UFC/mL). No entanto, a remoção dos biofilmes bem estabelecidos pode demorar mais de dois meses, mesmo submetidos a desinfecções iniciais e repetidas, semanalmente, com peróxido de hidrogênio a 2%.

Puttaiah; Seibert; Spears (2011) investigaram os efeitos de baixas concentrações de iodo presentes na água dos equipos odontológicos para o controle do biofilme nas linhas d'água. Esta pesquisa utilizou um simulador do sistema de água de equipos odontológicos com oito linhas d'água com funcionamento independente. Quatro equipos tinham reservatórios individuais e quatro equipos foram abastecidos diretamente com água do sistema público. Cartuchos de resina iodada foram conectados na parte proximal da saída de água dos alta rotação e seringas tríplice, bem como saída da água de abastecimento dos equipos. As amostras foram coletadas no início da pesquisa e duas vezes por semana por seis semanas, e semeadas em *R2A agar* e incubadas 22 a 24°C ambiente por 7 dias. Fragmento de linhas d'água de equipos foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV). Apenas as linhas d'água com cartuchos de resina iodada conectados na parte

proximal da saída de água dos equipos mostraram controle na formação de biofilme e redução da carga bacteriana para aquém de 200UFC/mL. Assim, os cartuchos de resina iodada conectados na parte proximal da saída de água dos equipos odontológicos demonstraram atividades antimicrobiana e antibiofilme.

De acordo com Rossi-Fedele et al. (2011), o objetivo desta investigação foi compreender o efeito das diferentes condições de armazenamento na estabilidade do desinfetante *Sterilox*[®]. Oito garrafas, quatro completamente cheias e quatro pela metade com solução recém-preparada do desinfetante foram divididas em quatro grupos e, subsequentemente, armazenadas (expostas ou protegidas da luz solar a $21^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$). A concentração de cloro foi monitorada por meio de fitas teste (cloro) até a concentração atingir zero ou até a décima terceira semana. Houve diferença entre os grupos expostos à luz solar e os grupos não expostos ($p<0,001$). A perda média de cloro por dia para as amostras não expostas foi de 1,01mg/L, enquanto a média para as amostras expostas foi de 2,42mg/L. A presença de ar não afetou a decomposição do cloro nas garrafas. Os resultados desta investigação indicaram que quando o desinfetante foi exposto à luz solar, a redução do cloro se iniciou a partir do quarto dia. No entanto, para os grupos protegidos da luz solar, o processo se iniciou somente após o décimo quarto dia.

Puttaiah et al. (2012) investigaram a eficácia de um protocolo automatizado de desinfecção com o tetra-acetil etilenodiamina (TAED) perborato. O protocolo de TAED perborato foi usado nos equipos odontológicos com uma unidade Autosteril (um dispositivo automatizado de desinfecção com solução de TAED perborato a 0,26% e água esterilizada para enxágue do sistema entre o atendimento dos pacientes e à noite). O protocolo foi repetido durante 30 ciclos. Os biofilmes foram analisados por microscópio confocal de varredura a laser e a quantificação das bactérias aeróbias totais nas amostras de água em placas de Petri com *R2A agar*. A atividade antimicrobiana do TAED perborato foi avaliada contra *Mycobacterium smegmatis* e *Bacillus subtilis*. Antes do protocolo de desinfecção, as amostras de água apresentaram contaminação maior que 5,6logUFC/mL e, após a desinfecção inicial, os níveis foram inferiores a 1,1logUFC/mL. O microscópio confocal de varredura a laser permitiu evidenciar a presença de células vivas no biofilme apenas antes da desinfecção. Na atividade antimicrobiana, todos os micro-organismos vegetativos

foram mortos em até 30s de contato com o desinfetante e em 5min para os esporos. Ainda, a corrosão dos equipos (materiais metálicos) foram relatados em equipos produzidos nos Estados Unidos, porém não nos italianos. Em conclusão, o protocolo de desinfecção com TAED perborato foi efetivo no controle do biofilme e da contaminação da água de equipos odontológicos.

Em 2012, Kramer et al. avaliaram a eficácia da tecnologia *PotoClean* (oxidação anódica de cloro) contra o biofilme de linhas d'água de equipos odontológicos. Em uma desinfecção regular e permanente com baixa concentração (1mg de Cl/L) e uma desinfecção intensiva e adicional (três vezes com 20mg de Cl/mL por 2h) com a *PotoClean* em três equipos foi avaliada a contaminação microbiana, a concentração de cloro total e o potencial redox durante 7 meses. Nas amostras de água foram adicionadas soluções de tiosulfato de sódio. Os equipos A e B tinham 15 anos e o equipo C, 5 anos. Após três desinfecções intensivas dos equipos A e B, a carga bacteriana (coliformes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella* spp.) e fúngica foi reduzida em menos de 7 dias. Posteriormente, a carga bacteriana aumentou novamente durante o período subsequente de 7 meses, embora a *PotoClean* tenha sido constantemente adicionada no sistema (1mg de Cl/L). Decorrido mais de 7,5 meses, apenas com a desinfecção regular e permanente com baixa concentração (1mg de Cl/L), ambos os equipos apresentaram desinfecções bem-sucedidas. O equipo C demonstrou isenção de contaminação bacteriana e controle da carga fúngica e depois da primeira desinfecção intensiva, não foram mais detectadas bactérias e fungos. Em suma, mesmo em alta rotação de equipos com design antigo e formação repleta de biofilmes, a tecnologia *PotoClean* demonstrou redução na contaminação microbiana da água.

Conforme Pareek et al. (2013), o objetivo da pesquisa foi comparar a eficácia do aloe vera, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio na redução da carga microbiana na água de 30 equipos odontológicos. As coletas das amostras de água foram realizadas antes e após a desinfecção das linhas d'água com formulações de aloe vera, peróxido de hidrogênio a 10% e hipoclorito de sódio a 5%. O cloro residual foi neutralizado com tiosulfato de sódio. A carga bacteriana das amostras de água foi determinada pelo número de UFC/mL. Houve redução da carga bacteriana antes e após a implementação da desinfecção em uma semana. Destaca-se a formulação de

aloe vera com a maior redução da contaminação bacteriana. Então, a formulação de aloe vera apresentou melhor atividade antibacteriana quando comparada aos demais desinfetantes nas linhas d'água dos equipos odontológicos.

Em 2014, Agahi et al. realizaram uma pesquisa para avaliar a eficácia de um antisséptico bucal (clorexidina) no controle da contaminação microbiana de equipos odontológicos. Um total de 35 equipos odontológicos (seringas tríplice e alta rotação) foram utilizados no experimento, sendo que cinco amostras de equipos e uma de torneira como controle. Amostras de água foram coletadas, assepticamente, em recipientes estéreis no início do expediente de trabalho, após *flush*. Os reservatórios de água foram esvaziados e adicionados com 50mL de clorexidina a 0,2%. Em seguida, as seringas tríplices e os alta rotação foram acionados para drenar através das linhas d'água a clorexidina até o esgotamento do reservatório. No dia seguinte, antes do início do expediente de trabalho, duas amostras de água das seringas tríplice e dos alta rotação foram coletadas. Decorrido o período de incubação a 25°C (ágar *Sabouraud*) e 37°C (ágar sangue) por 48h, a contagem do número de unidades formadoras de colônias por mililitro de água (UFC/mL) foi determinada. Todos os 35 equipos apresentaram contaminação antes do uso da clorexidina por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Cladosporium* sp., *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp. e *Candida albicans*. Ainda, não houve diferença entre a carga microbiana das seringas tríplice e dos alta rotação ($p=0,09$). No entanto, após o emprego da clorexidina nas linhas de água dos equipos, nenhuma contaminação foi detectada a partir da terceira semana. Desta forma, esta pesquisa demonstrou que o uso de clorexidina pode reduzir as contagens microbianas nas amostras de água de linhas d'água de equipos odontológicos.

Em 2014, Barbot et al. compararam as atividades antimicrobianas e antibiofilmes de desinfetantes comumente utilizados nas linhas d'água de equipos odontológicos (cloro, peróxido de hidrogênio e *Oxygenal 6*) contra *Candida albicans* (ATCC 3153), *Candida glabrata* (IHEM 9556), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) – (*Sabouraud dextrose agar* a 20°C por 48h) e *Hartmannella vermiformis* (ATCC 50802) (ameba de vida livre) – (PYNFH suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos a 20°C por 5 dias) em biofilmes (único tipo de micro-organismo e mistos) formados com água de torneira. O peróxido de hidrogênio não apresentou atividades

antimicrobiana e antibiofilme. Por outro lado, o cloro foi efetivo, mas apenas nas concentrações mais elevadas e, provavelmente, não compatíveis com o uso em linhas d'água de equipos. O *Oxygenal 6* foi o produto que mostrou a melhor atividade antimicrobiana contra as leveduras, entretanto na presença da ameba de vida livre houve uma redução na atividade antibiofilme contra *C. albicans*. Em conclusão, os desinfetantes não eliminaram, completamente, as leveduras e/ou a ameba de vida livre. Além disso, as condições planctônicas e sésseis (única espécie ou mistas) dos micro-organismos devem ser consideradas para determinação das atividades antimicrobiana e antibiofilme dos desinfetantes empregados nas linhas d'água de equipos odontológicos.

Dallolio et al. (2014) compararam a eficácia de diferentes métodos de desinfecção em relação à qualidade microbiológica da água e à presença de biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos. Um total de 5 equipos foram selecionados e distribuídos como: 1 equipo (controle, sem desinfecção), 2 equipos (desinfecção intermitente com ácido peracético / peróxido de hidrogênio a 0,26%) e 2 equipos (desinfecção contínua com íon de hidrogênio / íons de prata a 0,02% e dióxido de cloro estabilizado a 0,22%, respectivamente). Após três meses da implementação dos protocolos de desinfecção, o sistema contínuo demonstrou melhores resultados do que o intermitente com relação à redução da carga microbiana da água. *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas Selective agar*), *Legionella*, esporos de *Clostridium* (*Sulfite Agar*), *Staphylococcus aureus* (*Baird Parker Agar*) e estreptococos β -hemolíticos (*Columbia CNA-CV Blood Agar*) não foram reportados nos equipos com desinfecção contínua. Ademais, o biofilme nas linhas d'água dos equipos submetidos à desinfecção intermitente apresentou maior extensão, espessura e fendas do que nos equipos com desinfecção contínua. Em suma, o protocolo e os produtos para desinfecção contínua das linhas de água dos equipos odontológicos apresentou resultados melhores na redução da carga microbiana e do biofilme do que a desinfecção intermitente.

Em 2015, Bowen et al. determinaram a eficácia da desinfecção de linhas d'água de equipos odontológicos por meio de dois desinfetantes na forma de pastilha (*A-Dec ICX* e *Citrissil*). Um total de 47 equipos odontológicos foram utilizados para a avaliação da carga bacteriana da água em placas *Millipore HPC agar* e incubação a

25°C por 72h. Em quatro equipos, o protocolo de desinfecção com *A-Dec ICX* por 10 semanas foi instituído. Além disso, um outro equipo serviu de controle negativo e não foi submetido à desinfecção ou atendimento de paciente. Inicialmente, todos os equipos tiveram as cargas bacterianas determinadas na fase 1. Todos os 5 equipos foram desinfetados com *Sterilex Liquid Ultra* (“protocolo de choque”) durante a primeira semana de amostragem. Dois equipos foram escolhidos aleatoriamente para serem submetidos ao protocolo A e receberam pastilhas de *A-dec ICX* em cada recarga de água do reservatório. Os outros dois equipos foram escolhidos aleatoriamente para o protocolo B e receberam pastilhas de *Citrisil* em cada recarga de água dos reservatórios. Após 5 semanas, esses equipos foram desinfetados com o “protocolo de choque” (*Sterilex Liquid Ultra*) e foram submetidos ao outro protocolo de desinfecção com pastilhas. A água da torneira foi utilizada como fonte para abastecimento dos reservatórios de água. Amostras também foram coletadas, inicialmente, para o estabelecimento da carga bacteriana das fontes de água de cada clínica odontológica. Não houve diferença entre os desinfetantes (*A-dec ICX* e *Citrisil*), mas houve diferença com o controle negativo. Ainda, *Pseudomonas fluorescens* e *Cupriavidus pauculus* foram isoladas de um equipo. Em conclusão, o protocolo com *A-dec ICX* apresentou melhor redução na carga bacteriana das águas de equipos odontológicos do que o *Citrisil*. Ademais, um período mínimo de duas semanas com “protocolo de choque” é recomendado.

Hikal, Zaki, Sabry (2015) caracterizaram as cepas de *Acanthamoeba* (amebas) isoladas das linhas de água dos equipos odontológicos com análise morfológica e técnicas de biologia molecular. Além disso, avaliaram *in vitro* a desinfecção com ozônio. As amostras de água das torneiras, unidades auxiliares (torneiras) e das seringas triplice foram coletadas antes e após o término do expediente de trabalho, cultivadas em placas de Petri com ágar não nutriente e incubadas a 37°C e 40°C. A identificação das *Acanthamoeba* spp. foi realizada com auxílio de PCR com base na análise da sequência de genes do RNAr 18S. A resposta celular ao ozônio foi avaliada contra cistos de *Acanthamoeba* spp. em diferentes concentrações e períodos de exposições. As taxas de prevalência nas amostras de água por *Acanthamoeba* spp. foram de 72% (torneiras) e 100% (torneiras das unidades auxiliares e seringas triplice). A análise morfológica revelou a presença de *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba griffin*, *Acanthamoeba hatchitti* e

Acanthamoeba lenticulata. A análise filogenética mostrou que as quatro cepas estavam intimamente relacionadas com um tipo de sequência genética (T3, T4, T5 e T11). As células das amebas foram coradas com azul de tripano, evidenciando a morte após exposição à água ozonizada por 10min. Não houve crescimento das amebas após a desinfecção dos reservatórios dos equipos com ozônio (fluxo de 500mg/h) por 5min. Desta forma, o ozônio demonstrou ser um desinfetante potente, podendo desempenhar um papel importante no controle da contaminação amebiana das linhas d'água de equipos odontológicos.

Segundo Lal et al. (2015), o objetivo desta pesquisa foi investigar a capacidade da *Vermamoeba vermiformis* (ameba) em atuar como um vetor para bactérias e, dessa forma, contribuir para disseminação bacteriana através da água de equipos odontológicos. As amostras de água dos equipos desinfetados com Alpron foram semeadas em meio de cultura para detecção de *Legionella* spp. Além disso, a *Vermamoeba vermiformis* foi cultivada com *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* durante 8 semanas e a análise realizada por MEV. Somente a *Serratia marcescens* foi isolada e identificada (biologia molecular) das amostras de água dos equipos. Ademais, a exposição ao Alpron indicou que esse desinfetante foi efetivo, em condições laboratoriais contra a *S. marcescens*, e que a *Vermamoeba vermiformis* desenvolveu de forma similar com a *Serratia marcescens* e a *E. coli* ($p=0,0001$). Entretanto, não foi evidenciado a presença da *S. marcescens* dentro da *Vermamoeba vermiformis*. Concluiu-se nesta pesquisa que, provavelmente, a *Vermamoeba vermiformis* não funcione como um vetor para disseminação da *S. marcescens*.

Petti; Polimeni; Allen (2015) determinaram a atividade antimicrobiana de um desinfetante constituído com peróxido de hidrogênio e prata monovalente em equipos odontológicos contaminados artificialmente com micro-organismos. Os micro-organismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (Mannitol Salt Agar a 37°C por 48h), *Enterococcus faecalis* (Enterococcosel Agar a 37°C por 48h), *Candida albicans* (Bismuth Sulphite Glucose Glycine Yeast Agar a 30°C por 48h), *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudosel Agar a 37°C por 48h), *Legionella pneumophila* (Legionella BCYE Agar a 37°C por dez dias com 2,5% CO₂), *Mycobacterium chelonae* (Middlebrook 7H10 a 37°C por seis semanas) e *Bacillus clausii* (esporos). Suspensões

bacterianas foram inoculadas nas partes internas das canetas de alta rotação esterilizadas que, em seguida, foram conectadas as linhas d'água dos equipos. A desinfecção das linhas d'água dos equipos foi realizada com peróxido de hidrogênio a 3% e prata a 0,001% por 10min. Canetas de alta rotação (controle) não foram desinfetadas. A média das cargas bacterianas detectadas nas canetas de alta rotação variaram de 10^5 a 10^7 UFC. As médias das reduções foram de 7,5 logUFC para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*; 6,3 logUFC para *Candida albicans*; 5,4 logUFC para *Legionella pneumophila*; 5,3 logUFC para *Mycobacterium chelonae*; e 2,9 logUFC para *Bacillus clausii*. Assim, a desinfecção das linhas d'água dos equipos odontológicos com peróxido de hidrogênio e prata poderia minimizar o risco de transmissão microbiana aos pacientes durante o tratamento odontológico.

Em 2016, Ditommaso et al. avaliaram a atividade bactericida *in vitro* do peróxido de hidrogênio contra *Legionella pneumophila*. O *Peroxy Ag⁺* (peróxido de hidrogênio a 3% com prata a 0,001%) foi avaliado em um equipo odontológico simulado e acoplado a um dispositivo (equipamento de higienização de água) contaminado artificialmente com *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 (ATCC 33152) – meio de cultura *Legionella BCYE Agar* incubado a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias. O emprego do *Peroxy Ag⁺* durante 60min reduziu a carga bacteriana em 2,4log. As melhores atividades antibacterianas foram obtidas com períodos prolongados de exposição: redução de 4,19log por 75min e de 5,39log por 15h. Com o uso do equipamento de higienização de água observou-se uma redução de 88,77 e 82,21% da carga bacteriana por 8min30s e 16min30s, respectivamente. Ainda, a maior redução da carga bacteriana foi evidenciada após 75min de tempo de contato (99,997%). Então, a desinfecção com *Peroxy Ag⁺* reduziu a contaminação por *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 em sistema simulado de equipo odontológico acoplado ao equipamento de higienização de água.

Costa et al. (2016a) avaliaram a atividade antibiofilme de três desinfetantes (*Calbenium*, *Oxygenal 6* e *Sterispray*) em linhas d'água de equipos odontológicos, conforme a recomendação dos fabricantes. Um modelo dinâmico que simulou as condições de funcionamento de um equipo odontológico foi desenvolvido com biofilmes polimicrobianos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e

Vermamoeba vermiformis – ameba de vida livre). A capacidade dos produtos para reduzir ou erradicar a formação de biofilme foi avaliada. Os produtos mostraram variabilidade de ação de acordo com a composição, concentração e os diferentes tipos de micro-organismos avaliados. *Vermamoeba vermiformis* foi resistente aos produtos, independentemente, das concentrações. Ainda, *Calbenium* reduziu de forma mais eficiente os biofilmes, sendo que na concentração de 0,5% apresentou a melhor atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, em comparação com *Sterispray* a 2% e 3%. A eficiência máxima de *Oxygenal 6* foi observada a partir de 3% contra *Pseudomonas aeruginosa*, mas não foi capaz de eliminar totalmente a *Candida albicans*. Com relação a *Vermamoeba vermiformis*, o *Calbenium* não apresentou qualquer atividade. Destaca-se que em geral, a sobrevivência do *Vermamoeba vermiformis* pode contribuir para a manutenção de outros micro-organismos. Em conclusão, os desinfetantes apresentaram atividade antibiofilme parcial e concentrações mais adequadas poderiam ser empregadas para aumentar sua eficácia.

Em 2016b, Costa et al. determinaram as comunidades bacterianas e fúngicas presentes nas águas de equipos odontológicos (8 a 12 anos de uso, comumente, desinfetados) de dentistas europeus por meio de PCR quantitativo e sequenciamento genético. Amostras de água (1L) foram coletadas de torneira e alta rotação após períodos de estagnação da água e procedimentos odontológicos (adição de tiosulfato de sódio). Os resultados indicaram que o próprio equipo é a principal fonte de contaminação microbiana, e a estagnação da água, as práticas de manutenção dos equipos e o fornecimento de água aos equipos são parâmetros que norteiam a qualidade microbiológica da água. Apesar da desinfecção ter sido combinada com o *flush* de água, a carga microbiana dos alta rotação continuou elevada, bem como a diversidade bacteriana e fúngica. A ocorrência de micro-organismos potencialmente patogênicos em linhas d'água de equipos odontológicos submetidas à desinfecção demonstrou um potencial risco infeccioso tanto para pacientes quanto para os profissionais da odontologia. Uma “desinfecção de choque” antes de um período prolongado de estagnação de água nos equipos poderia diminuir a proliferação microbiana nas linhas d'água de equipos odontológicos. Além disso, destaca-se a necessidade de proceder um controle regular da qualidade da água dos equipos.

Segundo Lizon et al. (2016), o objetivo da pesquisa foi determinar a melhor forma para manutenção da contaminação bacteriana da água de equipamentos odontológicos em nível aceitável. Três métodos foram avaliados, sendo que o primeiro e o segundo utilizaram a desinfecção descontínua com *Dialox*TM (ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético) – (1 desinfecção por tempo e 3 desinfecções repetidas semanalmente, respectivamente). O terceiro método utilizou desinfecções descontínuas e contínuas feitas com uma mistura de *Bilpron* e *Alpron*. Os reservatórios dos equipamentos foram preenchidos com *Dialox*TM a 10% e, decorrido 30min de contato do produto com as linhas d'água, um *flush* com água foi realizado. Diariamente, o *Alpron* a 1% (*EDTA*, poliaminopropil biguanida e tosilcloramida de sódio) foi inserido nos reservatórios. O *Bilpron in natura* foi empregado nos reservatórios e linhas d'água dos equipamentos por períodos maiores que 24h. As análises foram realizadas para determinar a carga bacteriana em placas de Petri com ágar nutriente e incubação a 22°C e 36°C para os seguintes micro-organismos: coliformes totais, *Legionella* e *P. aeruginosa*. A eficiência do terceiro método (tratamento contínuo da água) foi consistente durante todo o período de monitoramento. Ressalta-se a carga bacteriana muito reduzida (~1UFC/mL) após 60 dias. Em suma, a desinfecção contínua associada ao uso de água esterilizada permitiu reestabelecer e manter a qualidade bacteriológica da água das linhas d'água de equipamentos odontológicos para nível aceitável (<200UFC/mL).

Em 2016, Pawar et al. compararam a redução da carga microbiana da água de equipamentos odontológicos submetidos aos diferentes protocolos de desinfecção. Cinco equipamentos foram utilizados para a avaliação da contaminação antes e após a implementação dos diferentes protocolos de desinfecção por quatro semanas: desinfecção contínua com peróxido de hidrogênio a 0,02%; desinfecção semanal contínua e de “choque” com peróxido de hidrogênio a 0,02% e 0,25%, respectivamente; desinfecção durante a noite com clorexidina a 0,12% e etanol a 12%; desinfecção durante a noite com Listerina (1:50); e desinfecção de manhã por 5min com perborato de sódio a 2% e *EDTA* a 2%. As amostras de água foram cultivadas em *R2A agar* para determinação do número de UFC/mL. Antes da implementação dos protocolos de desinfecção, todas as amostras mostraram carga microbiana elevada. Decorrido um dia de desinfecção, a contaminação microbiana reduziu e continuou em declínio de maneira progressiva nas semanas seguintes. Em conclusão, após quatro

semanas, todos os protocolos de desinfecção reduziram a contaminação microbiana da água dos equipos odontológicos para valores aquém de 200UFC/mL.

Segundo Fujita, Mashima, Nakazawa (2017), o objetivo da pesquisa foi determinar a atividade antimicrobiana de um aparelho de eletrólise (sistema *Poseidon-S*) que usa apenas o cloro presente na água de abastecimento público para desinfecção e controle da contaminação microbiana das linhas d'água de equipos odontológicos. Foram usados para a contaminação micro-organismos gram-positivos (*Streptococcus mutans* – ingbritt; *Streptococcus sanguinis* – ATCC 10556; *Enterococcus faecalis* – ATCC 19433; *Actinomyces naeslundii* – ATCC 12104; *Mogibacterium timidum* – ATCC 33093; *Lactobacillus casei* – ATCC 4646; *Propionibacterium acnes* – ATCC 6919), gram-negativos (*Veillonella parvula* – ATCC 10790; *Porphyromonas gingivalis* – ATCC 33277; *Prevotella intermedia* – ATCC 25611; *Fusobacterium nucleatum* – JCM 6328) e fungos (*Candida albicans* – 2S2, isolado clínico). A carga microbiana das amostras de água foi avaliada antes e após a instalação do sistema *Poseidon-S* em placas de Petri com *R2A agar* e incubação a 25°C por 5 a 7 dias. Além do mais, a atividade microbida e a citotoxicidade da água eletrolisada foram determinadas contra micro-organismos bucais e linhagens derivadas de células bucais humanas, respectivamente. Inicialmente, as médias das cargas microbianas foram de 10^3 a 10^6 UFC/mL, no entanto, após a instalação do sistema *Poseidon-S*, houve uma redução para menos de 10^2 UFC/mL. A água eletrolisada também apresentou atividade microbida considerável contra os micro-organismos presentes nas linhas d'água de equipos odontológicos e da microbiota bucal humana. Entretanto, apresentaram baixa citotoxicidade em relação às linhagens derivadas de células bucais humanas. Assim, o uso rotineiro do sistema *Poseidon-S* pode efetivamente manter reduzida a carga microbiana da água de equipos odontológicos.

Gitipour et al. (2017) pesquisaram as interações entre um desinfetante / produto comercial (ASAP-AGX-32) constituído de nanopartículas de prata com concentração de 0,0032% e o biofilme formado na linha d'água de equipo odontológico. Após o desenvolvimento de biofilme na linha d'água de um equipo odontológico, a desinfecção foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, simulando a realidade. As nanopartículas de prata apresentavam dimensões entre 3

e 5nm de diâmetro e estavam agrupadas por um polímero estabilizador. Durante o procedimento de desinfecção, o polímero estabilizador diminuiu parcialmente a agregação das nanopartículas de prata. Além disso, a especiação superficial das nanopartículas de prata antes e após a desinfecção foi de AgO e AgCl, respectivamente. Assim, as características das nanopartículas de prata do desinfetante demonstraram agregação e especiação diferentes antes e após o uso, que podem ter ocorrido em função da interação do produto com o biofilme formado na linha d'água do equipo odontológico.

Em 2017, Juraskova et al. determinaram a presença de *Legionella* spp. na água proveniente de linhas d'água de equipos odontológicos. A coleta das amostras foi realizada em duas etapas, sendo a primeira coleta (n=50 com *flush* por 5min) de água das linhas d'água dos equipos sem a implementação do procedimento de desinfecção. A segunda etapa (n=10) foi realizada com a implementação do procedimento de desinfecção com *Stabimed* a 1% por 30min e *flush* com água potável por 15min. Antes e após a desinfecção, 36% e 10% das amostras de água dos equipos apresentaram contaminação com *Legionella* spp., respectivamente. Em conclusão, a desinfecção com *Stabimed* a 1% por uma única vez foi capaz de reduzir o número de amostras de água das linhas d'água de equipos odontológicos por *Legionella* spp.

Shajahan et al. (2017) realizaram uma pesquisa para avaliar a substantividade de um novo desinfetante contra a formação de biofilmes em linhas de água de equipos odontológicos. Vinte equipos odontológicos foram divididos em dois grupos: Grupo A (desinfecção com uma solução diluída de *CleanCert*: *flush* através das linhas d'água e manutenção do produto durante a noite; Grupo B (equipos não submetidos à desinfecção). A formação de biofilme foi avaliada em ambos os grupos por um período de 10 dias por MEV. As imagens obtidas por MEV mostraram ausência de biofilmes nas linhas d'água submetidas a desinfecção (Grupo A) do primeiro ao sétimo dia. Além disso, uma possível presença de carbonato de cálcio (no oitavo dia), matriz de substâncias poliméricas (no nono dia) e células microbianas (no décimo dia) foram observadas. Entretanto, o grupo B (controle) apresentou presença de carbonato de cálcio (do primeiro ao quarto dia), de biofilme com cocos e bastonetes (quinto ao sétimo dia) e de biofilme maduro com uma densa população microbiana (oitavo ao

décimo dia). Desta forma, a solução de *CleanCert* demonstrou eficácia no controle da formação de biofilme por até 7 dias.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- ✓ Investigar as condições microbiológicas da água de clínica odontológica, bem como avaliar e desenvolver produto com aplicabilidade nas linhas d'água.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a carga microbiana (bactérias e fungos) da água de torneiras e equipos (reservatórios, seringas tríplice e alta rotação) de uma clínica odontológica antes e após a implementação de um protocolo para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos;
- ✓ Determinar as atividades antibacteriana e antibiofilme *in vitro* de substâncias com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos;
- ✓ Desenvolver e avaliar *in vitro* produtos antibiofilme com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa laboratorial / experimental que atende o objeto geral preestabelecido: investigar as condições microbiológicas da água de clínica odontológica, bem como avaliar e desenvolver produto com aplicabilidade nas linhas d'água.

4.1 Local de estudo

As coletas das amostras de água foram obtidas na Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O processamento e a análise microbiológica da pesquisa foram realizadas no laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

4.2 Procedimentos éticos em pesquisa

De acordo com a Resolução nº 466/2012, o projeto de pesquisa foi dispensado da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que não envolveu seres humanos.

4.3 Avaliação da carga microbiana da água de torneiras e equipamentos odontológicos

Um total de 27 amostras de água de torneiras e de equipamentos odontológicos (reservatórios, seringas triplice e alta rotação) – (Figura 1) foram coletadas da Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil. Cabe ressaltar que cada equipamento apresenta sua própria torneira para abastecimento de seu reservatório.

Figura 1 – Vista panorâmica da cadeira e do equipo odontológico da Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, com destaque para: A) reservatório, B) seringa tríplice; e C) alta-rotação. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora

As coletas foram realizadas em duas etapas distintas, sendo no início (julho de 2016/primeira coleta) e após sete meses (fevereiro de 2017/segunda coleta) da implementação de um protocolo para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos como rotina diária, segundo recomendações com base na literatura científica em procedimentos de biossegurança visando o controle de contaminação e risco de infecção.

O protocolo estipulou que no início do expediente de trabalho, o abastecimento dos reservatórios dos equipos odontológicos fosse realizados com água de torneira do sistema de abastecimento público e que no final do expediente, toda água presente nos reservatórios e nas linhas d'água (seringas tríplice e alta rotação) fossem esvaziados e drenadas, respectivamente (WATANABE, 2007). Ainda, antes e após cada atendimento, uma drenagem (*flush*) de água nas seringas tríplice e nos alta rotação por 30s foi recomendada (*American Dental Association*, 1996; *Centers for Disease Control and Prevention*, 1993).

Antes da coleta das amostras de água das torneiras foi realizado um *flush* de água por 30s. Em seguida, os reservatórios foram desconectados do equipo e a água residual (caso presente) foi descartada. Os reservatórios foram enxaguados por três

vezes com água de torneira e, após o preenchimento com a capacidade máxima, as amostras foram coletadas.

As amostras das seringas tríplex e dos alta rotação também foram coletadas após *flush* de água por 30s e com volume aproximado de 10mL em tubos de ensaio (25x150mm) esterilizados, de acordo com os princípios básicos de assepsia. Em seguida, as amostras de água foram acondicionadas em uma caixa térmica refrigerada e encaminhadas para o laboratório NEPECISS da EERP-USP. O tempo entre a coleta e o início do processamento microbiológico das amostras foi de cerca de 30min.

O experimento foi realizado em Cabine de Segurança Biológica Classe II tipo A1 (VECO, Campinas, SP, BR).

Adicionaram-se alíquotas de 50µL de tiosulfato de sódio a 2% (WATANABE, 2007) nas amostras de água, seguida de homogeneização em agitador de tubos AP-56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) e diluições decimais seriadas em solução salina a 0,85% esterilizada até a ordem de 10^{-4} .

As sementeiras das amostras (50µL) *in natura* e diluídas foram realizadas na superfície de placas de Petri (60x15mm) com meios de cultura convencionais para detecção de *Legionella* spp. (*Legionella Agar Base*® suplementado com *Legionella Agar Enrichment*® – BD Difco, Sparks, MD, EUA), bem como enterobactérias (*MacConkey Agar* – BD Difco, Sparks, MD, EUA). Ainda, 1mL das amostras *in natura* e diluídas foram semeadas para detecção de bactérias aeróbias totais (*Petrifilm*™ AC – 3M, St Paul, MN, EUA), bem como fungos filamentosos e leveduras (*Petrifilm*™ YM – 3M, St Paul, MN, EUA) – Figura 2.

Figura 2 – Vista panorâmica da sementeira de amostra de água no sistema *Petrifilm*™. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2018.

Fonte: elaborado pela autora

Decorrido o período de incubação, a leitura dos resultados das placas foi efetuada com auxílio de estereomicroscópio trinocular – modelo AQZ-DS4-TRI70 (Tecnival) sob luz refletida e os números de unidades formadoras de colônia de micro-organismos expressos por mililitro de amostra de água *in natura* (UFC/mL).

4.4 Atividades antibacteriana e antibiofilme *in vitro* em linhas d'água de equipos odontológicos

4.4.1 Atividade antibacteriana: concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração de um determinado agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento microbiano.

O teste de microdiluição foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo em U (KASVI Importação e Distribuição de Produtos para Laboratório Ltda, Curitiba, PR, Brasil) para determinar a CIM e como triagem inicial das substâncias com potencial atividade antibacteriana. O volume do meio de cultura (*Mueller Hinton Broth* BD – Difco, Sparks, MD, EUA) em concentração dupla mais a substância no primeiro poço da microplaca foi de 100µL e o volume do inóculo bacteriano de 5µL. As diluições das substâncias foram duplas de 1:2 a 1:64 (linhas A a F de cada placa). A padronização dos inóculos bacterianos (10^8 UFC/mL) realizados em comprimento de onda de 625nm com auxílio do espectrofotômetro – modelo 22PC (Spectrumlab®, China) com as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923). Os inóculos bacterianos foram diluídos (1:10) para obtenção de uma carga bacteriana de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Quando cada um dos inóculos (5µL) foi transferido para o meio de cultura, a concentração final bacteriana foi de cerca de 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço).

As linhas G e H de cada placa foram utilizadas como controles negativos e positivos, respectivamente. Nos controles negativos foram adicionados em cada um dos poços da placa de microdiluição (96 poços) apenas 100µL de *Mueller Hinton Broth*. Ainda, nos controles positivos, 100µL de *Mueller Hinton Broth* e 5µL do inóculo bacteriano padronizado (10^8 UFC/mL) e diluído 1:10.

4.4.2 Atividade antibiofilme: biomassa total

O cristal violeta (corante catiônico) é um dos corantes mais utilizados em técnicas de quantificação da biomassa total de biofilmes formada por micro-organismos (bactérias e fungos) e pode ser utilizado sem a necessidade da desagregação dos biofilmes.

O biofilme foi formado em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (KASVI Importação e Distribuição de Produtos para Laboratório Ltda, Curitiba, PR, Brasil) a partir da transferência de 1% do inóculo (*Escherichia coli* – ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* – ATCC 29923) padronizado (10^8 UFC/mL) para os poços com 100µl de *Tryptic Soy Broth* (Difco, Sparks, MD, EUA). A incubação foi realizada a 37°C por 24h ou 48h em estufa com agitação orbital (Quimis, Diadema, SP, Brasil), sendo que após 24h o meio de cultura foi substituído por outro novo.

Decorrido o período de incubação, o meio de cultura mais o inóculo bacteriano foram descartados e os poços enxaguados com solução salina a 0,85% por duas vezes para retirada das células planctônicas. As substâncias foram mantidas em contato com o biofilme formado por 24h, e uma outra lavagem com solução salina a 0,85% por duas vezes foi realizada, seguida de fixação com álcool etílico por 15min. Depois da retirada do solvente e da secagem das microplacas à temperatura ambiente, realizou-se a adição de solução de cristal violeta durante 5min. Novamente, os poços foram lavados com solução salina a 0,85% por três vezes e adicionou-se ácido acético a 33%. A quantificação indireta da biomassa total dos biofilmes foi determinada a partir das soluções de ácido acético por meio da medida da absorbância a 570nm no Multiskan® GO (Thermo Electron Corporation, Alemanha). Cada grupo experimental foi avaliado com n=11.

4.5 Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de produtos antibiofilmes com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos

Na literatura, diversas substâncias e produtos com aplicabilidade na melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos foram relatados (GAWANDE et al., 2008; ORRÙ et al., 2010; BANSAL et al., 2011; LIN et al., 2011; PAREEK et al., 2013; BARBOT et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; LIZO et

al., 2015; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; PAWAR et al., 2016), entretanto, no Brasil, ainda não há produto comercial aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para essa finalidade.

Neste projeto, utilizando-se de embasamento científico na revista da literatura e nos desafios existentes desta temática, a inovação tecnológica foi possível por meio do desenvolvimento de um produto passível de produção em larga escala e bem como comercialização. Formulações aquosas isoladas e/ou associadas com diferentes concentrações de substâncias como hipoclorito de sódio (PAREEK et al., 2013), ácido cítrico (FAOT et al., 2014), bicarbonato de sódio (GAWANDE et al., 2008), cloreto de sódio (CIRKOVIC et al., 2017), dodecil sulfato de sódio (GAWANDE et al., 2008), peróxido de hidrogênio (ORRÙ et al., 2010; LIN et al., 2011; PAREEK et al., 2013; BARBOT et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; LIZON et al., 2016; PAWAR et al., 2016), polissorbato 20 (SLOUP et al., 2016), quitosana (COBRADO et al., 2013) foram desenvolvidas e avaliadas quanto à possível aplicabilidade no controle do biofilme nas linha d'água de equipos odontológicos.

4.5.1 Atividade antibiofilme: Viabilidade Celular

O biofilme foi formado em placas para microscopia confocal (35x10mm) com lamínulas aderidas (22x22mm) conforme o item 4.2.2 *Atividade antibiofilme: biomassa total*. Os poços foram enxaguados com solução salina a 0,85% por três vezes para retirada das células planctônicas e corados com 100µl da solução *FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA). A solução cora de verde as células viáveis (vivas) e em vermelho as células com danos na membrana (mortas) e foi preparada diariamente antes do seu uso, sendo a mesma protegida da exposição pela luz e calor durante todos os procedimentos. Além disso, a leitura das células vivas e mortas no biofilme foi realizada com auxílio de microscópio de fluorescência *Axio Observer A1* (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) em aumento de 630x. As imagens obtidas por microscópio de fluorescência (diferentes campos) foram transferidas para o software *Image J* para realização da quantificação de células vivas e mortas no biofilme. Cada grupo experimental foi avaliado com n=15.

4.6 Análise estatística

Todos os dados coletados foram submetidos à codificação apropriada, validação por dupla digitação e exportados para o software BioEstat (versão 5.3) com nível de significância $\alpha=5\%$. A análise estatística de *Kruskall-Wallis* e o teste de *Student-Newman-Keuls* foram utilizados para os itens 4.3 *Avaliação da carga microbiana da água de torneiras e equipos odontológicos* e 4.4.1 *Atividade antibacteriana: concentração inibitória mínima*. Além disso, a ANOVA e o teste de *Tukey* foram empregados para os itens 4.4.2 *Atividade antibiofilme: biomassa total* e 4.5.1 *Atividade antibiofilme: Viabilidade Celular*.

5 RESULTADOS

A proposta desta pesquisa envolveu aspectos microbiológicos para a investigação das condições microbiológicas da água de clínica odontológica, bem como a avaliação e desenvolvimento de produto com aplicabilidade nas linhas d'água.

5.1 Avaliação da carga microbiana da água de torneiras e equipos odontológicos

As médias das cargas das contaminações das amostras de água das torneiras por bactérias aeróbias totais e fungos (unidades formadoras de colônias por mililitro – UFC/mL) foram respectivamente de 15,96UFC/mL (primeira coleta) e 0UFC/mL (segunda coleta); 3,74UFC/mL (primeira coleta) e 8,15UFC/mL (segunda coleta). Ademais, não houve diferença entre a carga microbiana (bactérias e fungos) nas coletas (primeira e segunda) das amostras de água das torneiras ($p=0,1094$) – Figura 3 e Apêndice A.

Figura 3 – Comparação entre as médias da carga microbiana (bactérias e fungos) das torneiras da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos experimentais ($p=0,1094$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Das 27 torneiras avaliadas, 6 (22,22%) da primeira coleta e nenhuma da segunda coleta estavam contaminadas com bactérias aeróbias totais, conferindo uma redução de 15,96 vezes de UFC/mL. Ainda, 8 (29,63%) da primeira coleta e 10

(37,04%) da segunda coleta apresentaram contaminação fúngica com um aumento de 2,18 vezes de UFC/mL. Destaca-se que todas as amostras apresentaram contaminação por bactérias aeróbias totais aquém de 500UFC/mL.

De acordo com a Figura 4 e Apêndice B, as médias das cargas das contaminações das amostras de água dos equipos odontológicos por bactérias aeróbias totais foram de 1,85UFC/mL (reservatório), 118,74UFC/mL (seringas tríplice) e 143,70UFC/mL (alta rotação) para primeira coleta e 0UFC/mL (reservatório), 0,22UFC/mL (seringas tríplice) e 0,63UFC/mL (alta rotação) para segunda coleta. Além disso, a carga de contaminação bacteriana dos alta rotação (primeira coleta) foi maior do que das coletas dos reservatórios (primeira – $p=0,0048$ e segunda – $p=0,0021$), das seringas tríplice (primeira – $p=0,036$ e segunda – $p=0,0046$), bem como dos alta rotação (segunda – $p=0,0497$).

Figura 4 – Avaliação das médias da carga de contaminação por bactérias aeróbias totais em amostras de água de equipos odontológicos da Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). RE – reservatório; ST – seringas tríplíces; AR – alta rotação. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Dos 27 equipos odontológicos investigados, 1 (3,70%) reservatório da primeira e nenhum da segunda coleta estava contaminado com bactérias aeróbias totais, representando assim uma redução de 1,85 vezes de UFC/mL. Além disso, 4 (14,81%) seringas tríplíces da primeira e 1 (3,70%) da segunda coleta apresentaram contaminação bacteriana com uma redução de 539,73 vezes de UFC/mL. Cabe

ressaltar que 2 (7,40%) seringas tríplex apresentaram carga bacteriana acima de 500UFC/mL (1.160UFC/mL e 2.040UFC/mL). Com relação aos alta rotação, 13 (48,15%) da primeira e 5 (18,52%) da segunda coleta estavam contaminados, retratando uma redução de 143,70 vezes de UFC/mL. Vale salientar que 2 (7,40%) alta rotação apresentaram contaminação bacteriana acima de 500UFC/mL (1.800UFC/mL e 1.460UFC/mL referentes à primeira coleta).

Conforme a Figura 5 e Apêndice C, as médias das cargas das contaminações das amostras de água dos equipos odontológicos por fungos foram de 1,56UFC/mL (reservatório), 21,15UFC/mL (seringas tríplex) e 114,04UFC/mL (alta rotação) para primeira coleta e 0,89UFC/mL (reservatório), 0,63UFC/mL (seringas tríplex) e 16,48UFC/mL (alta rotação) para a segunda coleta. Ainda, a carga de contaminação fúngica dos alta rotação (primeira coleta) foi maior do que das coletas dos reservatórios (primeira – $p=0,0055$ e segunda – $p=0,0002$), das seringas tríplex (primeira – $p=0,023$ e segunda – $p<0,0001$), bem como dos alta rotação (segunda – $p=0,0156$).

Figura 5 – Avaliação das médias da carga de contaminação por fungos em amostras de água de equipos odontológicos da Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). RE – reservatório; ST – seringas tríplex; AR – alta rotação. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Para as amostras dos reservatórios ($n=27$), 13 (48,15%) da primeira e 8 (29,63%) da segunda coleta estavam contaminadas por fungos, correspondendo a

uma redução de 1,75 vezes de UFC/mL. Quanto às 27 amostras de seringas triplices, 11 (40,74%) da primeira e 5 (18,52%) da segunda coleta mostraram contaminação fúngica, representando uma redução de 33,57 vezes de UFC/mL. A respeito dos alta rotação (n=27), 21 (77,77%) da primeira e 11 (40,74%) da segunda coleta estavam contaminadas por fungos e apresentaram uma redução de 6,92 vezes de UFC/mL.

Nos reservatórios, a carga por bactérias aeróbias totais das coletas (primeira – $p=0,0065$ e segunda – $p=0,0027$) foi maior do que da contaminação fúngica da primeira coleta (Figura 6 e Apêndices B e C).

Figura 6 – Comparação entre as médias da carga microbiana (bactérias e fungos) dos reservatórios dos equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Segundo a Figura 7 e Apêndices B e C, as médias das cargas das contaminações das amostras de água de seringas triplices por bactérias aeróbias totais e fungos foram respectivamente de 118,74UFC/mL (primeira coleta) e 0,22UFC/mL (segunda coleta); 21,15UFC/mL (primeira coleta) e 0,63UFC/mL (segunda coleta). Não houve diferença entre a carga microbiana (bactérias e fungos) das amostras de água das seringas triplices ($p=0,1493$).

Figura 7 – Comparação entre as médias da carga microbiana (bactérias e fungos) das seringas tríplice dos equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos experimentais ($p>0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Nos alta rotação, a carga de contaminação por bactérias aeróbias totais da primeira coleta foi maior do que da segunda ($p=0,0305$), bem como da carga por fungos da primeira coleta ($p=0,0483$). Com relação à segunda coleta, a carga bacteriana foi maior do que a fúngica na primeira coleta ($p<0,0001$). Além disso, a contaminação por fungos da primeira coleta foi maior do que a segunda ($p=0,0236$) – Figura 8.

Figura 8 – Comparação entre as médias da carga microbiana (bactérias e fungos) dos alta rotação dos equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

A respeito da contaminação das amostras de água das torneiras e dos equipos odontológicos (reservatórios, seringas tríplice e alta rotação), coliformes totais e fecais, bem como *Legionella* spp. não foram detectados.

5.2 Determinação das atividades antibacteriana e antibiofilme *in vitro* de substâncias e produtos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos

5.2.1 Atividade antibacteriana: Concentração Inibitória Mínima

Conforme a Tabela 1, os resultados das atividades antimicrobianas (CIM) contra as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram melhores para o hipoclorito de sódio do que polissorbato 20 ($p=0,0194$); peróxido de hidrogênio do que bicarbonato de sódio ($p=0,0377$), dodecil sulfato de sódio do que cloreto de sódio ($p=0,0377$), peróxido de hidrogênio do que cloreto de sódio ($p=0,0094$), dodecil sulfato de sódio do que polissorbato 20 ($p=0,0043$), e peróxido de hidrogênio do que polissorbato 20 ($p=0,0007$).

Tabela 1 – Avaliação da concentração inibitória mínima – CIM (mg/mL) das substâncias com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipos odontológicos. Ribeirão Preto, 2017.

Substâncias	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Hipoclorito de sódio	1,25	1,25	1,25
Ácido cítrico	3,13	1,56	3,13
Bicarbonato de sódio	12,50	12,50	25,00
Cloreto de sódio	75,00	75,00	150,00
Dodecil sulfato de sódio	0,58	0,58	0,58
Peróxido de hidrogênio	0,03	0,03	0,03
Polissorbato 20	500,00	500,00	500,00
Quitosana a 5%	-	-	-

Legenda: -, sem atividade antibacteriana.

5.2.2. Atividade antibiofilme: Biomassa Total

As médias e desvio padrão, respectivamente, das absorbâncias do cristal violeta da *E. coli* foram de: $0,741 \pm 0,097$ (mínimo: 0,575 e máximo: 0,862) para o controle negativo, $0,468 \pm 0,084$ (mínimo: 0,360 e máximo: 0,592) para o ácido cítrico a 30%, $0,512 \pm 0,278$ (mínimo: 0,110 e máximo: 0,849) para o bicarbonato de sódio a 30%, $0,333 \pm 0,034$ (mínimo: 0,235 e máximo: 0,372) para o cloreto de sódio a 30%,

0,525±0,083 (mínimo: 0,363 e máximo: 0,621) para o hipoclorito de sódio a 5% e 0,215±0,018 (mínimo: 0,179 e máximo: 0,236) para o peróxido de hidrogênio a 5%. Então, todas as substâncias apresentaram atividade antibiofilme quando comparadas ao controle negativo ($p<0,01$). O peróxido de hidrogênio a 5% demonstrou melhor atividade antibiofilme do que o ácido cítrico a 30%, bicarbonato de sódio a 30% e o hipoclorito de sódio a 5% ($p<0,01$).

Ainda, o cloreto de sódio a 30% mostrou atividade antibiofilme superior ao bicarbonato de sódio a 30% ($p<0,05$) e hipoclorito de sódio a 5% ($p<0,01$). Cabe ressaltar que o peróxido de hidrogênio a 5% e o cloreto de sódio a 30% não tiveram diferença quanto à atividade antibiofilme ($p>0,05$) – Figura 9 e Apêndice D.

Figura 9 – Avaliação das médias das atividades antibiofilmes dos produtos com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipos odontológicos com relação a *Escherichia coli*. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Conforme a Figura 10 e Apêndice E, as médias e desvio padrão das absorvâncias do cristal violeta da *P. aeruginosa* foram de: 1,008±0,116 (mínimo: 0,859 e máximo: 1,177) para o controle negativo, 0,652±0,141 (mínimo: 0,438 e máximo: 0,843) para o ácido cítrico a 30%, 1,020±0,135 (mínimo: 0,684 e máximo: 1,159) para o bicarbonato de sódio a 30%, 0,768±0,193 (mínimo: 0,470 e máximo: 1,026) para o cloreto de sódio a 30%, 0,840±0,082 (mínimo: 0,714 e máximo: 0,961) para o hipoclorito de sódio a 5% e 0,634±0,095 (mínimo: 0,486 e máximo: 0,832) para o peróxido de hidrogênio a 5%.

Dessa forma, apenas o bicarbonato de sódio não demonstrou atividade em comparação com o controle negativo ($p>0,05$). Por outro lado, o ácido cítrico ($p<0,05$) e o peróxido de hidrogênio ($p<0,01$) apresentaram as melhores atividades antibiofilme e foram superiores ao hipoclorito de sódio a 5%.

Figura 10 – Avaliação das médias das atividades antibiofilmes dos produtos com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipos odontológicos com relação a *Pseudomonas aeruginosa*. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

As médias e desvio padrão das absorbâncias do cristal violeta da *S. aureus* (Figura 11 e Apêndice F) foram de: $0,251\pm0,077$ (mínimo: 0,115 e máximo: 0,254) para o controle negativo, $0,171\pm0,061$ (mínimo: 0,103 e máximo: 0,256) para o ácido cítrico a 30%, $0,101\pm0,021$ (mínimo: 0,072 e máximo: 0,138) para o bicarbonato de sódio a 30%, $0,162\pm0,049$ (mínimo: 0,160 e máximo: 0,397) para o cloreto de sódio a 30%, $0,113\pm0,031$ (mínimo: 0,089 e máximo: 0,182) para o hipoclorito de sódio a 5% e $0,205\pm0,055$ (mínimo: 0,140 e máximo: 0,317) para o peróxido de hidrogênio a 5%).

Assim, apenas o peróxido de hidrogênio não mostrou atividade antibiofilme em relação ao controle negativo ($p>0,05$). Ressalta-se que o bicarbonato de sódio a 30% foi o único com melhor atividade antibiofilme quando comparado ao ácido cítrico ($p<0,05$).

Figura 11 – Avaliação das médias das atividades antibiofilmes dos produtos com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipamentos odontológicos com relação a *Staphylococcus aureus*. As letras iguais indicam que não há diferença ($p>0,05$) e as letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

5.3 Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de produtos antibiofilmes com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipamentos odontológicos

5.3.1. Atividade antibiofilme: Biomassa Total e Viabilidade Celular

Com base nos melhores resultados das atividades antibacteriana e antibiofilme (biomassa total) das substâncias avaliadas contra as diferentes bactérias padrão, decidiu-se formular dois produtos (*Wanitox A* e *Wanitox B*) para quantificação de células totais e viabilidade celular (células vivas/verdes e mortas/vermelhas).

A respeito da *E. coli*, as médias dos resultados obtidos foram do total de células: 1.448,1, vivas: 920,8 (63,6%) e mortas: 525,3 (36,4%) para o controle negativo, do total de células: 870,7, vivas: 504,9 (58,0%) e mortas: 365,9 (42,0%) para *Wanitox A* e do total de células: 1.248,9, vivas: 625,4 (50,1%) e mortas: 623,4 (49,9%) para *Wanitox B*. Assim, o *Wanitox A* apresentou menor número de células totais do que o controle negativo ($p<0,01$) e o *Wanitox B* ($p<0,05$). Ainda, o número de células vivas do *Wanitox A* ($p<0,01$) e do *Wanitox B* ($p<0,05$) foi menor do que o controle negativo. Por outro lado, o *Wanitox B* mostrou maior número de células mortas do que

o *Wanitox A* ($p < 0,01$), entretanto não houve diferença com relação ao controle negativo ($p > 0,05$) – Figuras 12 e 13 e Apêndice G.

Figura 12 – Avaliação das médias das atividades antibiofilmes das formulações com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipamentos odontológicos por microscópio de fluorescência (células vivas/mortas por campo com aumento de 630x) com relação a *Escherichia coli*. Para as mesmas cores (colunas), letras diferentes representam diferenças ($p < 0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Figura 13 – Avaliação *in vitro* da atividade antibiofilme de três produtos: A) controle negativo (solução salina a 0,85%); B) *Wanitox A*; e C) *Wanitox B* contra *Escherichia coli* por meio de microscópio de fluorescência (células vivas/mortas por campo com aumento de 630x). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Com relação a *P. aeruginosa*, as médias dos resultados obtidos foram do total de células: 894,8, vivas: 396,8 (44,3%) e mortas: 498,0 (55,7%) para o controle negativo, do total de células: 880,0, vivas: 479,2 (54,3%) e mortas: 400,8 (45,7%) para *Wanitox A* e do total de células: 1.330,0, vivas: 851,7 (64,0%) e mortas: 478,3 (36,0%) para *Wanitox B*. Dessa maneira, os dois produtos avaliados em comparação com o

controle negativo não apresentaram diferença na quantidade de células totais ($p=0,22$) e mortas ($p=0,92$). Entretanto, o *Wanitox B* apresentou mais células vivas do que o controle negativo e o *Wanitox A* ($p<0,01$) – Figuras 14 e 15 e Apêndice H.

Figura 14 – Avaliação das médias das atividades antibiofilmes das formulações com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipamentos odontológicos por microscópio de fluorescência (células vivas/mortas por campo com aumento de 630x) com relação a *Pseudomonas aeruginosa*. Para as mesmas cores (colunas), letras diferentes representam diferenças ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Figura 15 – Avaliação in vitro da atividade antibiofilme de três produtos: A) controle negativo (solução salina a 0,85%); B) *Wanitox A*; e C) *Wanitox B* contra *Pseudomonas aeruginosa* por meio de microscópio de fluorescência (células vivas/mortas por campo com aumento de 630x). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Em referência ao *S. aureus*, as médias dos resultados obtidos foram do total de células: 2.333,2, vivas: 1.290,3 (55,3%) e mortas: 1.043,0 (44,7%) para o controle negativo, do total de células: 803,9, vivas: 318,7 (39,6%) e mortas: 485,1 (60,4%) para

Wanitox A e do total de células: 668,3, vivas: 628,8 (94,1%) e mortas: 39,5 (5,9%) para *Wanitox B*.

Então, o *Wanitox A* e o *Wanitox B* apresentaram menor número de células totais do que o controle negativo ($p < 0,01$), entretanto não houve diferença entre eles ($p > 0,05$). Com relação às células vivas, o *Wanitox A* e o *Wanitox B* apresentaram um menor número do que o controle negativo, sendo que o *Wanitox A* mostrou um aumento na quantidade de células mortas, quando comparado com o *Wanitox B* ($p < 0,01$) – Figuras 16 e 17 e Apêndice I.

Figura 16 – Avaliação das médias das atividades antibiofilmes das formulações com possível aplicabilidade no tratamento de linhas d'água de equipos odontológicos por microscópio de fluorescência (células vivas/mortas por campo com aumento de 630x) com relação a *Staphylococcus aureus*. Para as mesmas cores (colunas), letras diferentes representam diferenças ($p < 0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

Figura 17 – Avaliação in vitro da atividade antibiofilme de três produtos: A) controle negativo (solução salina a 0,85%); B) *Wanitox A*; e C) *Wanitox B* contra *Staphylococcus aureus* por meio de microscópio de fluorescência (células vivas/mortas por campo com aumento de 630x). Ribeirão Preto, 2017.

Fonte: elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

Os equipos odontológicos são constituídos de reservatórios que permitem o fornecimento de água através das linhas d'água (diâmetros de 2 a 3mm) para as seringas tríplice e os alta rotação (COLEMAN et al., 2009). Entretanto, a formação do biofilme nessas linhas d'água estreitas representa uma fonte alarmante na contaminação microbiana da água (O'DONNELL et al., 2011; LAL et al., 2015; SHAJAHAN et al., 2017).

A literatura científica apresenta pesquisas que utilizaram o *flush* de água antes das coletas de amostras de água de equipos odontológicos (O' DONNELL et al., 2009; ABDALLAH e KHALIL, 2011; KRAMER et al., 2012, AGAHI et al., 2014; BOWEN et al., 2015; COSTA et al., 2016a; JURASKOVA et al., 2017; SHAJAHAN et al., 2017).

Nesta pesquisa, os reservatórios foram desconectados dos equipos e a água residual (caso presente) foi descartada. Os reservatórios foram enxaguados por três vezes com água de torneira e, após o preenchimento com a capacidade máxima, as amostras foram coletadas. Em seguida, as coletas das amostras de água das torneiras e dos equipos odontológicos (seringas tríplice e alta rotação) foram realizadas após *flush* de água por 30s.

A adição de tiosulfato de sódio nas amostras de água de torneiras e equipos odontológicos é de fundamental importância para inativação do cloro residual, que pode inibir o desenvolvimento dos micro-organismos (ABDALLAH e KHALIL, 2011; KRAMER et al., 2012; PAREEK et al., 2013; COSTA et al., 2016b).

Desse modo, nesta pesquisa, o tiosulfato de sódio foi adicionado na concentração final de 100mg/L de acordo com Watanabe (2007).

No que tange a determinação da microbiota da água das torneiras e equipos odontológicos, diferentes meios de cultura foram reportados na literatura científica: ágar de extrato de levedura (PERCIVAL et al., 2009); ágar não nutriente (HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015); ágar sangue (AGAHI et al., 2014); *Baird-Parker agar* (GAWANDE et al., 2008; DALLOLIO et al., 2014); *Bismuth Sulphite Glucose Glycine Yeast Agar* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); caldo mineral básico (GAWANDE et al., 2008); *Columbia CNA-CV Blood Agar* (DALLOLIO et al., 2014); *Columbia Blood Agar* (GAWANDE et al., 2008); *Enterococcusel Agar* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Legionella BCYE Agar* (PETTI, POLIMENI E ALLEN, 2015; DITOMMASO et al., 2016); *MacConkey Agar* (PERCIVAL et al., 2009); *Mannitol Salt Agar* (PETTI; POLIMENI;

ALLEN, 2015); *Middlebrook 7H10 agar* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Middlebrook 7H10 agar* suplementado OADC (Orrù et al., 2010); *Middlebrook 7H9 agar* (GAWANDE et al., 2008); *Milipore HPC agar* (BOWEN et al., 2015); *Pseudomonas Selective Agar* (DALLOLIO et al., 2014); *Pseudomonas Agar* (PERCIVAL et al., 2009); *Pseudosel Agar* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); PYNFH suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos (BARBOT et al., 2014); *R2A agar* (BANSAL et al., 2011; LIN et al., 2011; PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011; LAL et al., 2015; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Sabouraud Dextrose Agar* (AGAHl et al., 2014; BARBOT et al., 2014); *Sulfite Agar* (DALLOLIO et al., 2014); *Tryptic Soy Agar* (GAWANDE et al., 2008); *Tryptic Soy Broth* (GAWANDE et al., 2008); TSBYK (GAWANDE et al., 2008); *Yeast Extract Charcoal Agar* (GAWANDE et al., 2008). Ainda, técnicas de biologia molecular como sequenciamento genético (O'DONNELL et al., 2009; LAL et al., 2015; COSTA et al., 2016b) e PCR (ORRÙ et al., 2010; HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015; COSTA et al., 2016b) foram mencionados pelos autores das pesquisas.

Em relação aos micro-organismos presentes em amostras de água de equipos odontológicos, diversos autores relataram bactérias: *Arthrobacter agilis* (O'DONNELL et al., 2009); coliformes totais (ABDALLAH; KHALIL, 2011; KRAMER et al., 2012; LIZON et al., 2016); *Cupriavidus pauculus* (BOWEN et al., 2015); *Escherichia coli* (ABDALLAH; KHALIL, 2011; KRAMER et al., 2012; AGAHl et al., 2014; LAL et al., 2015); estreptococos β -hemolíticos (DALLOLIO et al., 2014); *Klebsiella*, (AGAHl et al., 2014); *Kocuria palustris* (O'DONNELL et al., 2009); *Legionella* spp. (KRAMER et al., 2012; DALLOLIO et al., 2014; LAL et al., 2015; LIZON et al., 2016; JURASKOVA et al., 2017); *Micrococcoccus luteus* (O'DONNELL et al., 2009); *Pseudomonas aeruginosa* (ABDALLAH; KHALIL, 2011; KRAMER et al., 2012; AGAHl et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; LIZON et al., 2016); *Pseudomonas fluorescens* (BOWEN et al., 2015); *Rhodococcus fascians* (O'DONNELL et al., 2009); *Serratia marcescens* (LAL et al., 2015); e *Staphylococcus aureus* (AGAHl et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014); fungos: *Candida albicans* (AGAHl et al., 2014); *Cladosporium* (AGAHl et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014); e *Penicillium* (AGAHl et al., 2014); e parasitas: *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba griffin*, *Acanthamoeba hatchitti* e *Acanthamoeba lenticulata* (HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015); e *Vermamoeba vermiformis* (LAL et al., 2015).

Segundo a legislação brasileira, a água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras devem estar em conformidade com o padrão microbiológico estabelecido pelo Ministério da Saúde, com ausência de *Escherichia coli* e coliformes totais em 100mL de água (BRASIL, 2004).

Nesta pesquisa, a contaminação das amostras de água das torneiras e dos equipos odontológicos (reservatórios, seringas tríplex e alta rotação) por meio dos sistemas *Petrifilm*TM AC e *Petrifilm*TM YM foram empregados para detecção de bactérias aeróbias totais, bem como fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. Ainda, em meios de cultura convencionais, a *Legionella* spp. (*Legionella Agar Base*[®] suplementado com *Legionella Agar Enrichment*[®]) e enterobactérias (*MacConkey Agar*) não foram detectadas.

De acordo com as técnicas empregadas para a avaliação da carga microbiana das amostras de água, o sistema *Petrifilm*TM foi utilizado nesta pesquisa por apresentar vantagens como otimização do tempo e espaço para incubação e armazenamento, quando comparados com os métodos convencionais.

No Brasil, de acordo com a portaria nº 518 do Ministério da Saúde, o limite permitido da contaminação por bactérias aeróbias totais na água destinada ao consumo humano é de 500UFC/mL (BRASIL, 2004). Ademais, *American Dental Association* (ADA, 1996) estabeleceu no ano 2000 que a carga bacteriana das águas dos equipos odontológicos não deveria exceder 200UFC/mL.

Entretanto, autores relataram contaminações de amostras de água de equipos odontológicos com contagens acima de 200UFC/mL e 500UFC/mL (PERCIVAL et al., 2009; LIN et al., 2011).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2004), nenhuma das nossas amostras de água das torneiras mostrou contaminação acima do limite permitido (Apêndice A). No entanto, apenas na primeira coleta, 2 (7,4%) seringas tríplex e alta rotação apresentaram carga bacteriana além de 500UFC/mL (Apêndice B).

De acordo com a ADA (1996), apenas na primeira coleta, 2 (7,4%) seringas tríplex e 4 (14,8%) alta rotação demonstraram contaminação bacteriana além de 200UFC/mL (Apêndice B).

Acerca da contaminação da água por fungos, ainda não há parâmetro nacional e/ou internacional estabelecido a respeito da qualidade fúngica da água destinada ao consumo humano e de equipos odontológicos. Todavia, o seu

monitoramento e controle frequentes são de suma importância para a biossegurança na odontologia, visto que fungos filamentosos e leveduras foram isolados da água de equipos odontológicos (AGAHÍ et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014).

Com relação às amostras de água das torneiras desta pesquisa, não houve diferença entre ($p=0,1094$) a carga bacteriana e fúngica (Figura 3 e Apêndice A).

Assim, a implementação do protocolo para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água dos equipos odontológicos demonstrou uma redução na carga bacteriana ($p=0,0497$) – (Figura 4 e Apêndice B) e carga fúngica (Figura 5 e Apêndice C), somente nos alta rotação. Essa estratégia de esvaziamento dos reservatórios, drenagem e manutenção das linhas d'água vazias e o *flush* de água das seringas triplice e alta rotação entre os atendimentos sugerem o controle na formação do biofilme nas linhas d'água dos equipos odontológicos.

Em sistemas simulados de contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos, a literatura reporta o uso de: *Actinomyces naeslundii*, (GAWANDE et al., 2008; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ORRÚ et al., 2010); *Bacillus clausii* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Candida albicans* (GAWANDE et al., 2008; ORRÚ et al., 2010; BARBOT et al., 2014; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; COSTA et al., 2016a; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Candida glabrata* (ORRÚ et al., 2010; BARBOT et al., 2014); *Candida parapsilosis*, (ORRÚ et al., 2010; BARBOT et al., 2014); enterobactérias (PERCIVAL et al., 2009); *Enterococcus faecalis* (ORRÚ et al., 2010; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Escherichia coli* (ORRÚ et al., 2010); *Fusobacterium nucleatum* (GAWANDE et al., 2008; ORRÚ et al., 2010; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Hartmannella vermiformis* (BARBOT et al., 2014); *Klebsiella pneumoniae* (GAWANDE et al., 2008); *Lactobacillus casei* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 (DITOMMASO et al., 2016); *Legionella. pneumophila* (GAWANDE et al., 2008; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Mogibacterium timidum* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Mycobacterium avium* (GAWANDE et al., 2008); *Mycobacterium chelonae* (GAWANDE et al., 2008); *Mycobacterium chelonae* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Mycobacterium gordonae* (GAWANDE et al., 2008); *Mycobacterium marinum*, (ORRÚ et al., 2010); *Peptostreptococcus micros* (ORRÚ et al., 2010); *Porphyromonas gingivalis* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Prevotella intermedia* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Propionibacterium acnes*

(FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Pseudomonas aeruginosa* (GAWANDE et al., 2008; ORRÙ et al., 2010; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; COSTA et al., 2016a); *Pseudomonas* spp. (PERCIVAL et al.; 2009); *Staphylococcus aureus* (GAWANDE et al., 2008; ORRÙ et al., 2010; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Streptococcus mutans* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Streptococcus sanguinis* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Veillonella parvula* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); e *Vermamoeba vermiformis* (COSTA et al., 2016a).

Nesta pesquisa, cepas padrão de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram utilizadas para determinação das atividades antibacteriana e antibiofilme *in vitro* de produtos com aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos por apresentarem características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e epidemiológicas diferentes.

E. coli são bastonetes gram-negativos pertencentes à família das enterobactérias. São encontrados em esgoto, efluentes tratados, águas naturais e solos sujeitos à contaminação fecal recente de humanos e animais de sangue quente. Por representar um dos patógenos humanos mais importantes, sua presença requer providências imediatas, pois pode causar infecções urinárias, meningites e infecções intestinais (TRABULSI et al., 2008; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

P. aeruginosa são bastonetes gram-negativos não fermentadores mais frequentemente isolados clínicos. São os microrganismos mais ubiqüitários, visto que são encontrados no solo, na água, nos vegetais, nos animais, nos alimentos e em ambientes hospitalares. Raramente causam infecção em um paciente imunocompetente, porém em indivíduos imunocomprometidos são os principais agentes etiológicos. São considerados um dos patógenos oportunistas mais importantes relacionados à infecção hospitalar. Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, devido à sua ampla expressão de fatores de virulência, bem como resistência aos antimicrobianos (TRABULSI et al., 2008; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

S. aureus são cocos gram-positivos que estão agrupados como cachos de uva, sendo um dos patógenos mais importantes, uma vez que causa uma grande variedade de infecções classificadas como localizadas a disseminadas com elevada gravidade, principalmente, por meio de cepas multirresistentes. Em geral, as doenças causadas por essa bactéria podem ser classificadas como superficiais, invasivas ou

tóxicas, ou ainda apresentar características mistas, tóxicas e invasivas (TRABULSI et al., 2008; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Com referência à literatura científica, as substâncias e os produtos utilizados na desinfecção das linhas d'água de equipos odontológicos foram: ácido acético (LIZON et al., 2016); ácido peracético (LIZON et al., 2016); *Actichlor*TM (ABDALLAH e KHALIL 2011); *A-dec ICX* (BOWEN et al., 2015); aloe vera (PAREEK et al., 2013); Alpron (LAL et al., 2015); bicarbonato de sódio (GAWANDE et al., 2008); Calbenium[®] (COSTA et al., 2016a); clorexidina (AGAHÍ et al., 2014; PAWAR et al., 2016); Citrisil (BOWEN et al., 2015); *CleanCert* (SHAJAHAN et al., 2017); cloro (BARBOT et al., 2014); *Dialox*TM (LIZON et al., 2016); dióxido de cloro (BANSAL et al., 2011; DALLOLIO et al., 2014); dodecil sulfato de sódio (GAWANDE et al., 2008); *Ecasol* (O'DONNELL et al., 2011); *Ecasol* com solução eletroquímica (O'DONNELL et al., 2009); *EDTA* (PERCIVAL et al., 2009; PAWAR et al., 2016); etanol (PAWAR et al., 2016); hipoclorito de sódio (PAREEK et al., 2013); íons de prata (DALLOLIO et al., 2014); Listerina (PAWAR et al., 2016); metaperiodato de sódio (GAWANDE et al., 2008); *Oxygenal 6*, (GAWANDE et al., 2008; BARBOT et al., 2014; COSTA et al., 2016a); ozônio (HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015); *PeraSafe* (GAWANDE et al., 2008); perborato de sódio (PAWAR et al., 2016); peróxido de hidrogênio (ORRÚ et al., 2010; LIN et al., 2011; PAREEK et al., 2013; BARBOT et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; LIZON et al., 2016; PAWAR et al., 2016); peróxido de hidrogênio e prata (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015); *Peroxy Ag+* (DITOMMASO et al., 2016); *PotoClean* (KRAMER et al., 2012); sistema *Poseidon-S* (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017); *Sterilex Liquid Ultra* (BOWEN et al., 2015), *Sterilex Ultra* (GAWANDE et al., 2008); *Sterilox* (ROSSI-FEDELE et al., 2011); *Sterispray*[®] (COSTA et al., 2016a); tetra-acetil etilenodiamina perborato (PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011).

Com relação à legislação brasileira (BRASIL, 2004), nenhuma das nossas amostras de água de torneira mostrou contaminação por bactérias aeróbias totais acima do limite permitido (Apêndice A). No entanto, apenas na primeira coleta, 2 (7,4%) seringas tríplex e alta rotação apresentaram contaminação além de 500UFC/mL (Apêndice B).

Em relação à literatura científica, a carga bacteriana na água dos equipos odontológicos reduziu para menos de 500UFC/mL, após a desinfecção com: dióxido de cloro (BANSAL et al., 2011), peróxido de hidrogênio (LIN et al., 2011), *A-dec ICX* (BOWEN et al., 2015), *Peroxy Ag+* (DITOMMASO et al., 2016). Além disso, houve

redução na contaminação bacteriana para menos de 200UFC/mL com o uso de: iodo (PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011), peróxido de hidrogênio, clorexidina e etanol (PAWER et al., 2016); EDTA (PERCIVAL et al., 2009), Alpron (LIZON et al., 2016); sistema Poseidon-S (FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017).

Outros produtos como peróxido de hidrogênio a 3% e prata a 0,001% evidenciaram redução da carga bacteriana de 7,5logUFC para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*; 6,3logUFC para *Candida albicans*; 5,4logUFC para *Legionella pneumophila*; 5,3logUFC para *Mycobacterium chelonae*; e 2,9logUFC para *Bacillus clausii* (PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015). Ainda, Puttaiah et al. (2012) relataram a redução de 5,6logUFC/mL com o uso da tetra-acetil etilenodiamina (TAED) perborato.

As substâncias isoladas e combinadas: bicarbonato de sódio, metaperiodato de sódio e dodecil sulfato de sódio reduziram biofilme bacteriano e fúngico (GAWANDE et al., 2008). Ademais, aloe vera, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio (PAREEK et al., 2013) apresentaram atividade antimicrobiana, e íons de hidrogênio/íons de prata e dióxido de cloro (desinfecção contínua) e ácido peracético/peróxido de hidrogênio (desinfecção intermitente) – (DALLOLIO et al., 2014) atividade antibiofilme.

Stabimed reduziu *Legionellas* spp. (JURASKOVA et al., 2017), e *CleanCert* demonstrou eficácia no controle da formação de biofilme por até 7 dias (SHAJAHAN et al., 2017). Por outro lado, os desinfetantes (*Calbenium*, *Oxygenal 6* e *Sterispray*) apresentaram atividade antibiofilme parcial e concentrações mais adequadas poderiam ser empregadas para aumentar sua eficácia (COSTA et al., 2016a).

Destaca-se nesta pesquisa as dificuldades na solubilidade e estabilidade das formulações aquosas das substâncias: dodecil sulfato de sódio, polissorbato 20 e quitosana.

Então, a partir dos nossos melhores resultados obtidos das concentrações inibitórias mínimas, as substâncias (ácido cítrico, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio) foram formuladas em diferentes concentrações para avaliação da atividade antibiofilme (biomassa total).

As melhores atividades antibiofilme foram do peróxido de hidrogênio a 5% (*E. coli* e *P. aeruginosa*), ácido cítrico a 30% (*P. aeruginosa*) e bicarbonato de sódio a 30% (*S. aureus*).

No que tange a presença de biofilme em linhas d'água de equipos, a análise foi realizada com auxílio de microscópio eletrônico de varredura (O' DONNELL et al., 2009; LIN et al., 2011; PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011; LAL et al., 2015; SHAJAHAN et al., 2017) e microscópio confocal de varredura a laser (ORRÙ et al., 2010; BANSAL et al., 2011; LIN et al., 2011; PUTTAIAH et al., 2012) com *BacLight* (PERCIVAL et al., 2009; BANSAL et al., 2011).

Nas amostras desta pesquisa, o *FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit* foi empregado e a leitura das células vivas e mortas no biofilme realizada com auxílio de microscópio de fluorescência.

Dessa maneira, o *Wanitox A* foi o produto com a melhor avaliação da atividade antibiofilme (viabilidade celular) contra a *E. coli* e *S. aureus*. Por outro lado, contra a *P. aeruginosa*, ambos os produtos não apresentaram atividade quando comparados com o controle negativo. Destaca-se que os nossos produtos permaneceram em contato com o biofilme por apenas 24h, sendo que a literatura científica faz referência do uso de substâncias e produtos por um período mais prolongado (PERCIVAL et al., 2009; LIN et al., em 2011; BOWEN et al., 2015; HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015; DITOMMASO et al., 2016; LIZON et al., 2016).

Então, concordamos que o biofilme funciona como verdadeira fonte de contaminação microbiana (células planctônicos e sésseis) altamente resistente aos agentes antimicrobianos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017), sendo que uma vez formado, não há meio químico capaz de removê-lo.

Como exemplo, temos dois artigos científicos com títulos que representam a realidade da contaminação microbiana alarmante das águas de equipos: *Doctor, would you drink water from your dental unit?* ("Doutor, você beberia a água de seu equipo odontológico?") de Prevost et al. (1995), e *Water, water everywhere but not a drop to drink* ("Água, água em toda parte, mas nenhuma gota para beber") de Smith et al. (1999).

Enfim, uma abordagem científica e multidisciplinar entre microbiologia, química e odontologia permitiu o avanço do conhecimento da contaminação microbiana da água, bem como o desenvolvimento tecnológico de produtos antibiofilmes com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos.

CONCLUSÃO

- ✓ Todas as amostras de água das torneiras apresentaram carga bacteriana dentro do parâmetro estabelecido pela legislação brasileira;
- ✓ A carga bacteriana foi maior do que a fúngica nas amostras de água dos reservatórios e dos alta rotação (primeira coleta);
- ✓ A carga microbiana (bactérias e fungos) da primeira coleta dos alta rotação foi maior do que a dos reservatórios, das seringas triplice (primeira e segunda coletas) e dos alta rotação (segunda coleta);
- ✓ A implementação do protocolo para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água dos equipos odontológicos demonstrou uma redução nas cargas bacteriana e fúngica apenas nos alta rotação;
- ✓ Nas amostras de água das torneiras e dos equipos odontológicos não foram detectadas enterobactérias e *Legionella* spp.;
- ✓ Ácido cítrico, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio foram as substâncias que demonstraram as melhores atividades antibacterianas (concentração inibitória mínima);
- ✓ As atividades antibiofilmes (biomassa total) superiores foram constatadas com o peróxido de hidrogênio a 5% (*E. coli* e *P. aeruginosa*), o ácido cítrico a 30% (*P. aeruginosa*) e o bicarbonato de sódio a 30% (*S. aureus*);
- ✓ Produtos (*Wanitox A* e *Wanitox B*) foram desenvolvidos com possível aplicabilidade na desinfecção de linhas d'água de equipos odontológicos;
- ✓ O *Wanitox A* foi o produto com as melhores atividades antibiofilmes (viabilidade celular) contra a *E. coli* e o *S. aureus*.

Assim, os produtos desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram possível aplicabilidade para o enfrentamento do biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos, que permanece como um dos grandes desafios na odontologia. Ainda, pesquisas adicionais são necessárias para o aperfeiçoamento e aplicabilidade desses produtos.

REFERÊNCIAS¹

ABDALLAH, S. A.; KHALIL, A. I. Impact of cleaning regimes on dental water unit contamination. **Journal of Water and Health**, v. 9, n. 4, p. 647-652, 2011.

AGAHI, R. H.; HASHEMIPOUR, M. A.; KALANTARI, M.; AYATOLLAH-MOSAVI, A.; AGHASSI, H.; NASSAB, A. H. G. Effect of 0.2% chlorhexidine on microbial and fungal contamination of dental unit waterlines. **Dental Research Journal**, v. 11, n. 3, p. 351–356, 2014.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (ADA). ADA Statement on dental unit waterlines. **The Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 11, p. 185-186, 1996.

BANSAL, R.; PUTTAIAH, R.; HARRIS, R.; REDDY, A. Evaluation of two methods in controlling dental treatment water contamination. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 12, n. 2, p. 73-83, 2011.

BARBOT, V.; COSTA, D.; DEBORDE, M.; IMBERT, C. Efficacy of dental unit disinfectants against *Candida* spp. and *Hartmannella vermiformis*. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 289-96, 2014.

BLAKE, G. C. The incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. **British Dental Journal**, v. 115, n. 3, p. 413-416, 1963.

BOWEN, C. G.; GREENWOOD, W.; GUEVARA, P.; WASHINGTON, M. A. Effectiveness of a dental unit waterline treatment protocol with A-Dec ICX and Citrisil disinfectants. **Military Medicine**, v. 180, n. 10, p. 1098-104, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommended infection-control practices for dentistry. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 28, n. 42 (RR-8), p. 1-12, 1993.

¹Segundo Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP. 3ª Edição. Revisada, ampliada e modificada. 2016. Parte I (ABNT) e ABNT NBR 6023.

CIRKOVIC, I.; PAVLOVIC, B.; BOZIC, D. D.; JOTIC, A.; BAKIC, L.; MILOVANOVIC, J. Antibiofilm effects of topical corticosteroids and intranasal saline in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps depend on bacterial species and their biofilm-forming capacity. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 274, n. 4, p. 1897-1903, 2017.

COBRADO, L.; SILVA-DIAS, A.; AZEVEDO, M. M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. *In vivo* antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 126-130, 2013.

COLEMAN, D. C.; O'DONNELL, M. J.; SHORE AC, RUSSELL RJ. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1424-37, 2009.

COSTA, D.; GIRARDOT, M.; BERTAUX, J.; VERDON, J.; IMBERT, C. Efficacy of dental unit waterlines disinfectants on a polymicrobial biofilm. **Water Research**, v. 91, p. 38-44, 2016.

COSTA, D.; MERCIER, A.; GRAVOUIL, K.; LESOBRE, J.; VERDON, J.; IMBERT, C. Occurrence and diversity of both bacterial and fungal communities in dental unit waterlines subjected to disinfectants. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 7, 2016.

DALLOLIO, L.; SCUDERI, A.; RINI, M. S.; VALENTE, S.; FARRUGGIA, P.; SABATTINI, M. A. B.; PASQUINELLI, G.; ACACCI, A.; RONCARATI, G.; LEONI, E. Effect of different disinfection protocols on microbial and biofilm contamination of dental unit waterlines in community dental practices. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 2, p. 2064-2076, 2014.

DITOMMASO, S.; GIACOMUZZI, M.; RICCIARDI, E.; ZOTTI, C. M. Efficacy of a low dose of hydrogen peroxide (Peroxy Ag⁺) for continuous treatment of dental unit water lines: challenge test with *Legionella pneumophila* serogroup 1 in a simulated dental unit waterline. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 5, 2016.

FAOT, F.; CAVALCANTI, Y. W.; MENDONÇA E BERTOLINI, M. D.; PINTO L. D. R.; DA SILVA, W. J.; DEL BEL CURY, A. A. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. **BioMed Central Oral Health**, v. 14, n. 77, 2014.

FUJITA, M.; MASHIMA, I.; NAKAZAWA, F. Monitoring the decontamination efficacy of the novel Poseidon-S disinfectant system in dental unit water lines. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 3, p. 270-276, 2017.

GAWANDE, P. V.; LOVETRI, K.; YAKANDAWALA, N.; ROMEO, T.; ZHANEL, G. G.; CVITKOVITCH, D. G.; MADHYASTHA, S. Antibiofilm activity of sodium bicarbonate, sodium metaperiodate and SDS combination against dental unit waterline-associated bacteria and yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 986-992, 2008.

GITIPOUR, A.; AL-ABED, S. R.; THIEL, S. W.; SCHECKEL, K. G.; TOLAYMAT, T. Nanosilver as a disinfectant in dental unit waterlines: Assessment of the physicochemical transformations of the AgNPs. **Chemosphere**, v. 173, p. 245-252, 2017.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HIKAL, W.; ZAKI, B.; SABRY, H. Evaluation of ozone application in dental unit water lines contaminated with pathogenic *Acanthamoeba*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 3, p. 410-419, 2015.

JURASKOVA E. S.; SEDLACKOVA, H.; JANSKA, J.; HOLY, O.; LALOVA, I.; MATOUSKOVA, I. *Legionella* spp. in dental unit waterlines. **Bratislavské Lekárske Listy**, v. 118, n. 5, p. 310-314, 2017.

KELSTRUP, J.; FUNDER-NIELSEN, T. D.; THEILADE, J. Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 177-183, 1977.

KRAMER, A.; KOBURGER, T.; TAUBE, L. D.; MENZEL, M.; MEYER, G.; ASSADIAN, O. Evaluation of the PotoClean® decontamination technology for reprocessing of water supply lines in dental units during routine work. **GSM Krankenhaushygiene Interdisziplinär**, v. 7, n. 1, 2012.

LAL, S.; SINGHRAO, S. K.; ACHILLES-DAY, U. E.; MORTON, L. H. G.; PEARCE, M.; CREAN, S. Risk Assessment for the spread of *Serratia marcescens* within dental-unit waterline systems using *Vermamoeba vermiformis*. **Current microbiology**, v. 71, n. 4, p. 434-442, 2015.

LIN, S. M.; SVOBODA, K. K. H.; GILETTO, A.; SEIBERT, J.; PUTTAIAH, R. Effects of hydrogen peroxide on dental unit biofilms and treatment water contamination. **European Journal of Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 47-59, 2011.

LIZON, J.; FLORENTIN, A.; MARTRETTE, J. M.; RIVIER, A.; CLEMENT, C.; RABAUD, C. Microbial control of dental unit water: Feedback on different disinfection methods experience. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 2, p. 247-249, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.

MILLS, S. E.; KARPAY, R. I. Dental waterlines and biofilm-searching for solutions. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 23, n. 3, p. 237-258, 2002.

O'DONNELL, M. J.; BOYLE, M.; SWAN, J.; RUSSELL, R. J.; COLEMAN, D. C. A centralised, automated dental hospital water quality and biofilm management system using neutral Ecasol maintains dental unit waterline output at better than potable quality: a 2-year longitudinal study. **Journal of Dentistry**, v. 3, n. 10, p. 748-762, 2009.

O'DONNELL, M. J.; BOYLE, M. A.; RUSSELL, R. J.; COLEMAN, D. C. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. **Future Microbiology**, v. 6, n. 10, p.1209-1226. 2011.

ORRÙ, G.; DEL NERO, S.; TUVERI, E.; CIUSA M. L.; PILIA, F.; ERRIU, M.; ORRÙ, G.; LICIARDI, M.; PIRAS, V.; DENOTTI, G. Evaluation of antimicrobial-antibiofilm activity of a hydrogen peroxide decontaminating system used in dental unit water lines. **The Open Dentistry Journal**, v. 20, n. 4, p. 140-146, 2010.

PAREEK, S.; NAGARAJ, A.; SHARMA, P.; ATRI, M.; WALIA, S.; NAIDU, S.; YOUSUF, A. Disinfection of Dental Unit Water Line Using Aloe Vera: *In Vitro* Study. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.

PAWAR, A.; GARG, S.; MEHTA, S.; DANG, R. Breaking the Chain of Infection: Dental Unit Water Quality Control. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 7, p. ZC80-ZC84, 2016.

PERCIVAL, R.S.; DEVINE, D.A.; NATTRESS, B.; KITE, P.; MARSH, P.D. Control of microbial contamination in dental unit water systems using tetra-sodium EDTA. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1081-1088, 2009.

PETTI, S.; POLIMENI, A.; ALLEN, M, J. Dental unit water treatment with hydrogen peroxide and monovalent silver ions artificially contaminated with freshly isolated pathogens. **Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità**, v. 27, n. 6, p. 789-798, 2015.

PORTEOUS, N. B.; PARTIDA, M. N. The effect of frequent clinical use of dental unit waterlines on contamination. **New York State Dental Journal**, v. 75, n. 3, p. 20-24, 2009.

PREVOST, A. P.; ROBERT, M.; CHARLAND, R.; BARBEAU, J. Doctor, would you drink water from your dental unit? **New York State Dental Journal**, v. 61, n. 12, p. 22-28, 1995.

PUTTAIAH, R.; SEIBERT, J.; SPEARS, R. Effects of iodine in microbial control of dental treatment water. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 12, n. 3, p. 143-151, 2011.

PUTTAIAH, R.; SVOBODA, K. K. H.; LIN, S. M.; MONTEBUGNOLI, L.; DOLCI, G.; SPRATT, D.; SIEBERT, J. Evaluation of an automated dental unit water system's contamination control protocol. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2012.

ROSSI-FEDELE, G.; DOGRAMACI, E. J.; STEIER, L.; DE FIGUEIREDO, J. A. P. Some factors influencing the stability of Sterilox®, a super-oxidised water. **British Dental Journal**, v. 210, n. 12, 2011.

SHAJAHAN, I. F.; KANDASWAMY, D.; LAKSHMINARAYANAN, L.; SELVARAJAN, R. Substantivity of hypochlorous acid-based disinfectant against biofilm formation in the dental unit waterlines. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 1, p. 2-5, 2017.

SLOUP, R. E.; CIEZA, R.J.; NEEDLE, D.B.; ABRAMOVITCH, R. B.; TORRES, A. G.; WATERS, C. M. Polysorbates prevent biofilm formation and pathogenesis of *Escherichia coli* O104:H4. **Biofouling**, v. 32, n. 9, p. 1131-1140, 2016.

SMITH, A.J.; HOOD, J.; BAGG, J.; BURKE, F. T. Water, water everywhere but not a drop to drink? **British Dental Journal**, v. 186, n. 1, p. 12-14, 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 935 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 780 p.

WATANABE, E. **Água de equipo odontológico**: técnicas convencionais e modernas para avaliar a contaminação microbiana. 2007. 142 f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Apêndice A - Carga microbiana (bactérias e fungos) das amostras de água (torneiras). Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Torneiras	Bactérias		Fungos	
		1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta
1	CL2-2	0	0	0	2
2	CL2-3	0	0	0	7
3	CL2-5	0	0	0	0
4	CL2-8	0	0	0	0
5	CL2-9	0	0	0	9
6	CL2-10	0	0	0	4
7	CL2-11	0	0	0	0
8	CL2-13	0	0	11	0
9	CL2-14	0	0	0	0
10	CL2-15	1	0	0	78
11	CL2-17	0	0	0	0
12	CL2-18	0	0	0	0
13	CL2-19	0	0	0	41
14	CL2-21	0	0	0	51
15	CL2-22	0	0	0	1
16	CL2-24	0	0	0	0
17	CL2-28	0	0	36	0
18	CL2-30	20	0	42	0
19	CL2-31	81	0	3	0
20	CL2-32	0	0	0	0
21	CL2-33	97	0	3	0
22	CL2-36	0	0	2	26
23	CL2-37	0	0	0	0
24	CL2-38	0	0	0	1
25	CL2-39	231	0	1	0
26	CL2-41	1	0	0	0
27	CL2-43	0	0	3	0
Média		15,96	0,00	3,74	8,15

Legenda: UFC/mL, unidades formadoras de colônias por mililitro de água.

Apêndice B – Avaliação da contaminação da água dos equipamentos odontológicos por bactérias aeróbias totais com auxílio do sistema *Petrifilm™* AC. Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Equipo	Reservatório		Seringa Tríplice		Alta rotação	
		1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta
1	CL2-2	0	0	0	0	1	1
2	CL2-3	0	0	0	0	0	0
3	CL2-5	0	0	0	0	0	0
4	CL2-8	0	0	0	0	0	0
5	CL2-9	50	0	0	0	0	0
6	CL2-10	0	0	0	0	0	0
7	CL2-11	0	0	0	0	0	0
8	CL2-13	0	0	0	0	1	1
9	CL2-14	0	0	0	0	1	0
10	CL2-15	0	0	0	0	2	0
11	CL2-17	0	0	0	0	0	1
12	CL2-18	0	0	0	0	350	12
13	CL2-19	0	0	1	0	0	0
14	CL2-21	0	0	0	6	42	0
15	CL2-22	0	0	0	0	0	0
16	CL2-24	0	0	0	0	200	0
17	CL2-28	0	0	0	0	1	0
18	CL2-30	0	0	1160	0	1800	0
19	CL2-31	0	0	0	0	0	0
20	CL2-32	0	0	0	0	10	0
21	CL2-33	0	0	2040	0	0	0
22	CL2-36	0	0	0	0	0	0
23	CL2-37	0	0	0	0	0	0
24	CL2-38	0	0	0	0	2	0
25	CL2-39	0	0	0	0	0	0
26	CL2-41	0	0	5	0	10	2
27	CL2-43	0	0	0	0	1460	0
Média		1,85	0,00	118,74	0,22	143,70	0,63

Legenda: UFC/mL, unidades formadoras de colônias por mililitro de água.

Apêndice C – Avaliação da contaminação da água dos equipamentos odontológicos por fungos com auxílio do sistema *Petrifilm™* YM. Clínica Odontológica II da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Equipo	Reservatório		Seringa Tríplice		Alta rotação	
		1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta
1	CL2-2	5	0	31	2	30	6
2	CL2-3	0	2	0	8	4	3
3	CL2-5	0	0	1	0	0	219
4	CL2-8	0	4	0	1	32	3
5	CL2-9	0	3	3	3	17	24
6	CL2-10	0	1	0	0	6	9
7	CL2-11	0	1	0	0	1	21
8	CL2-13	0	3	0	0	0	0
9	CL2-14	8	5	1	3	0	43
10	CL2-15	0	0	0	0	11	0
11	CL2-17	0	0	2	0	2	107
12	CL2-18	9	0	0	0	670	8
13	CL2-19	2	0	0	0	2100	0
14	CL2-21	0	0	0	0	1	0
15	CL2-22	0	0	0	0	31	0
16	CL2-24	1	0	0	0	3	0
17	CL2-28	1	0	1	0	11	0
18	CL2-30	3	5	1	0	1	0
19	CL2-31	6	0	520	0	5	0
20	CL2-32	2	0	0	0	2	2
21	CL2-33	2	0	4	0	3	0
22	CL2-36	1	0	3	0	65	0
23	CL2-37	0	0	0	0	0	0
24	CL2-38	0	0	4	0	75	0
25	CL2-39	1	0	0	0	9	0
26	CL2-41	0	0	0	0	0	0
27	CL2-43	1	0	0	0	0	0
Média		1,56	0,89	21,15	0,63	114,04	16,48

Legenda: UFC/mL, unidades formadoras de colônias por mililitro de água

Apêndice D - Avaliação *in vitro* das atividades antibiofilmes (*Escherichia coli*) das substâncias com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Controle Negativo	Ácido cítrico a 30%	Bicarbonato de sódio a 30%	Cloreto de sódio a 30%	Hipoclorito de sódio a 5%	Peroxido de hidrogênio a 5%
1	0,5751	0,3597	0,1103	0,2354	0,3629	0,2188
2	0,6096	0,3615	0,1747	0,2898	0,4170	0,1791
3	0,6571	0,3875	0,2523	0,3158	0,4674	0,2265
4	0,6755	0,4283	0,3310	0,3620	0,5163	0,2132
5	0,7526	0,4305	0,4141	0,3724	0,5258	0,1912
6	0,7570	0,4569	0,5024	0,3667	0,5259	0,2222
7	0,7984	0,4801	0,5524	0,3413	0,5349	0,2296
8	0,8048	0,5101	0,8113	0,3689	0,5787	0,2034
9	0,8078	0,5470	0,8145	0,3179	0,6103	0,2364
10	0,8502	0,5895	0,8185	0,3146	0,6179	0,2248
11	0,8622	0,5923	0,8491	0,2802	0,6210	0,2074
Média	0,741	0,468	0,512	0,333	0,525	0,215
DP	0,097	0,084	0,278	0,034	0,083	0,018

Legenda: DP- Desvio Padrão.

Apêndice E – Avaliação *in vitro* das atividades antibiofilmes (*Pseudomonas aeruginosa*) das substâncias com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipamentos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Controle Negativo	Ácido cítrico a 30%	Bicarbonato de sódio a 30%	Cloreto de sódio a 30%	Hipoclorito de sódio a 5%	Peroxido de hidrogênio a 5%
1	0,8585	0,4380	0,6844	0,8734	0,7137	0,6229
2	0,8601	0,4575	0,9303	0,5685	0,7145	0,5738
3	0,9345	0,4840	0,9371	1,0078	0,7605	0,4857
4	0,9594	0,6143	0,9718	0,7622	0,8087	0,6785
5	0,9645	0,6245	1,0439	0,8200	0,8327	0,5145
6	0,9772	0,6960	1,0795	0,5074	0,8574	0,6210
7	1,0062	0,7048	1,0806	0,7287	0,8929	0,6189
8	1,0134	0,7469	1,0959	0,7236	0,8930	0,7237
9	1,1610	0,7524	1,1147	0,4701	0,9010	0,6654
10	1,1758	0,8079	1,1277	1,0256	0,9066	0,6385
11	1,1769	0,8425	1,1590	0,9557	0,9605	0,8323
Média	1,008	0,652	1,020	0,768	0,840	0,634
DP	0,082	0,141	0,135	0,193	0,082	0,095

Legenda: DP- Desvio Padrão.

Apêndice F – Avaliação *in vitro* das atividades antibiofilmes (*Staphylococcus aureus*) das substâncias com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Controle Negativo	Ácido cítrico a 30%	Bicarbonato de sódio a 30%	Cloreto de sódio a 30%	Hipoclorito de sódio a 5%	Peroxido de hidrogênio a 5%
1	0,1712	0,1133	0,0756	0,1715	0,0913	0,1398
2	0,1145	0,1030	0,0718	0,1599	0,0891	0,1594
3	0,1239	0,1202	0,0797	0,1880	0,0932	0,1550
4	0,1158	0,1361	0,0937	0,2597	0,1007	0,1850
5	0,1405	0,1427	0,1186	0,2354	0,1080	0,2366
6	0,1243	0,1481	0,0885	0,2696	0,1055	0,1857
7	0,1252	0,2331	0,1021	0,2375	0,0938	0,1868
8	0,1858	0,2425	0,1124	0,3166	0,1082	0,2290
9	0,2537	0,2542	0,1122	0,3967	0,1030	0,3169
10	0,2226	0,2556	0,1170	0,3472	0,1821	0,2801
11	0,2041	0,1351	0,1378	0,1778	0,1639	0,1777
Média	0,162	0,171	0,101	0,251	0,113	0,205
DP	0,049	0,061	0,021	0,077	0,031	0,055

Legenda: DP- Desvio Padrão.

Apêndice G - Avaliação *in vitro* das atividades antibiofilmes (*Escherichia coli*) das formulações dos produtos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipamentos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Solução salina a 0,85%			Wanitox A			Wanitox B		
	TOTAL	VIVAS	MORTAS	TOTAL	VIVAS	MORTAS	TOTAL	VIVAS	MORTAS
1	3368	1921	1447	1845	1619	226	1294	687	607
2	1980	1541	439	1299	994	305	1342	713	629
3	2301	1995	306	649	322	327	1257	652	605
4	614	451	163	1134	551	583	1416	820	596
5	966	737	229	1170	563	607	1279	649	630
6	1123	981	142	1178	588	590	1243	619	624
7	1015	739	276	773	394	379	1194	574	620
8	1832	977	855	1153	538	615	1039	539	500
9	2026	871	1155	938	657	281	767	568	199
10	711	601	110	436	325	111	1002	475	527
11	1827	854	973	643	504	139	707	342	365
12	1014	758	256	572	440	132	1001	496	505
13	871	659	212	805	300	505	988	494	494
14	986	704	282	620	424	196	1101	548	553
15	977	376	601	837	264	573	1024	488	536
16	1484	669	815	722	355	367	1194	596	598
17	1523	820	703	946	459	487	1211	383	828
18	-	-	-	374	148	226	2190	1070	1120
19	-	-	-	603	300	303	1356	710	646
20	-	-	-	717	352	365	1493	759	734
21	-	-	-	-	-	-	1535	765	770
22	-	-	-	-	-	-	1862	802	1060
23	-	-	-	-	-	-	1229	636	593
Média	1448,1	920,8	527,3	870,7	504,9	365,9	1248,9	625,4	623,4

Legenda: -, campos sem possibilidade de quantificação.

Apêndice H – Avaliação *in vitro* das atividades antibiofilmes (*Pseudomonas aeruginosa*) das formulações dos produtos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Solução salina a 0,85%			Wanitox A			Wanitox B		
	TOTAL	VIVAS	MORTAS	TOTAL	VIVAS	MORTAS	TOTAL	VIVAS	MORTAS
1	533	274	259	206	158	48	1003	626	377
2	1357	395	962	469	73	396	1500	1116	384
3	498	276	222	2275	1116	1159	2310	1255	1055
4	447	252	195	2312	760	1552	668	314	354
5	1023	143	880	618	512	106	1391	875	516
6	160	63	97	834	442	392	1172	934	238
7	674	570	104	865	425	440	748	453	295
8	470	403	67	836	618	218	1606	1212	394
9	257	219	38	697	426	271	2036	1631	405
10	620	522	98	902	538	364	1617	404	1213
11	577	373	204	806	501	305	1370	697	673
12	252	234	18	733	429	304	2057	1611	446
13	261	170	91	418	287	131	1989	1565	424
14	479	124	355	343	61	282	1720	1343	377
15	1399	833	566	641	402	239	1198	886	312
16	790	691	99	700	465	235	977	378	599
17	377	342	35	790	526	264	825	476	349
18	957	827	130	824	484	340	861	446	415
19	510	371	139	649	296	353	678	330	348
20	385	263	122	1703	928	775	844	294	550
21	916	463	453	860	617	243	1360	1040	320
22	878	360	518	-	-	-	-	-	-
23	1146	533	613	-	-	-	-	-	-
24	7654	515	7139	-	-	-	-	-	-
25	436	430	6	-	-	-	-	-	-
26	462	429	33	-	-	-	-	-	-
27	404	395	9	-	-	-	-	-	-
28	1131	640	491	-	-	-	-	-	-
Média	894,8	396,8	498,0	880,0	479,2	400,8	497,7	851,7	478,3

Legenda: -, campos sem possibilidade de quantificação.

Apêndice I – Avaliação *in vitro* das atividades antibiofilmes (*Staphylococcus aureus*) das formulações dos produtos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2017.

#	Solução salina a 0,85%			Wanitox A			Wanitox B		
	TOTAL	VIVAS	MORTAS	TOTAL	VIVAS	MORTAS	TOTAL	VIVAS	MORTAS
1	889	493	396	756	290	466	301	268	33
2	1059	577	482	1183	453	730	142	125	17
3	1324	761	563	610	164	446	1405	1383	22
4	1572	956	616	744	130	614	84	38	46
5	3370	2005	1365	118	30	88	18	4	14
6	2114	1264	850	1021	434	587	67	11	56
7	2730	1447	1283	502	73	429	428	392	36
8	2181	1211	970	637	152	485	59	21	38
9	2439	1270	1169	321	68	253	175	21	154
10	2342	1269	1073	372	101	271	78	63	15
11	2653	1245	1408	341	10	331	667	594	73
12	2695	1623	1072	152	44	108	1972	1928	44
13	2906	1660	1246	717	63	654	507	443	64
14	3019	1583	1436	1080	467	613	631	556	75
15	3139	1852	1287	1043	502	541	277	193	84
16	1926	1175	751	1583	774	809	613	590	23
17	1991	883	1108	1859	939	920	3884	3879	5
18	1715	1000	715	418	225	193	591	583	8
19	2872	1524	1348	1299	703	596	130	101	29
20	3002	1642	1360	806	239	567	984	969	15
21	2662	1500	1162	1201	597	604	1004	993	11
22	2731	1446	1285	56	13	43	686	678	8
23	-	-	-	1670	860	810	-	-	-
Média	2333,2	1290,3	1043,0	803,9	318,7	485,1	668,3	628,8	39,5

Legenda: -, campos sem possibilidade de quantificação.