UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

ERICK SILVA DALLALANA

Água em elevada temperatura: é viável a sua aplicabilidade no controle do biofilme de equipo odontológico?

RIBEIRÃO PRETO

2019

ERICK SILVA DALLALANA

Água em elevada temperatura: é viável a sua aplicabilidade no controle do biofilme de equipo odontológico?

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 Enfermagem Fundamental.

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

Orientador: Evandro Watanabe

RIBEIRÃO PRETO

2019

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.

Dallalana, Erick Silva
Água em elevada temperatura: é viável a sua aplicabilidade no controle do biofilme de equipo odontológico? Ribeirão Preto, 2019.
48 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. 3. Desinfecção. 4. Linha d'água de Equipo Odontológico. 5. Microbiologia da Água. 6. Temperatura Alta.

DALLALANA, Erick Silva

Água em elevada temperatura: é viável a sua aplicabilidade no controle do biofilme de equipo odontológico?

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 Enfermagem Fundamental.

Aprovado em ...../...../.....

Comissão Julgadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Carlos Milani Dallalana e Tereza Augusta Silva Dallalana, que foram sempre exemplos de dignidade, honestidade e trabalho e nas suas possibilidades sempre mostraram os caminhos corretos a serem seguidos. Meu respeito, carinho e amor por vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe com sua paciência, conhecimento e sabedoria, os meus mais profundos agradecimentos por tudo o que fez por mim não só pelo desenvolvimento do meu trabalho, mas também nos momentos difíceis que a vida nos coloca; foi um ombro amigo e uma luz nas dificuldades.

À Profa. Dra. Denise de Andrade, por ter me acolhido, pela paciência e pelos conhecimentos transferidos; foi não só uma professora, mas também uma guia e um exemplo a ser seguido sempre.

À Prof. Dra. Maria Lucia do Carmo Cruz Robazzi, que foi muito importante para minha continuação no programa de pós-graduação com suas orientações e por acreditar em mim. Meus mais sinceros agradecimentos.

À minha amiga Rachel Maciel Monteiro com sua paciência, alegria e conhecimento; foi uma pessoa muito importante na conclusão desta pesquisa. Muito obrigado.

À família do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP.

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 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Aos meus amigos de laboratório Felipe Lazarini Bim e Lucas Lazarini Bim, pela ajuda e experiência adquirida durante toda a pesquisa realizada, vocês foram importantes para a conclusão da minha pesquisa. Obrigado.

À Etiene Karen de Oliveira, pessoa que compartilho minhas alegrias e aflições. Obrigado pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Às professoras Maria Débora Vendramini, Sara Gonzalez e Marilda Franco de Moura, pelo incentivo em todos os momentos que esta pesquisa foi realizada.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta jornada e que estarão comigo não só fisicamente, mas também em memória.

RESUMO

DALLALANA, Erick Silva. **Água em elevada temperatura: é viável a sua aplicabilidade no controle do biofilme de equipo odontológico?** 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Fundamental) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Na Odontologia, as linhas d'água de equipos odontológicos são substratos para a formação de biofilme e, consequentemente, dispersão dessa contaminação microbiana para água destinada ao tratamento odontológico. O objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade antibiofilme da água em elevada temperatura contra *Pseudomonas aeruginosa*, visando à sua aplicabilidade em linhas d'água de equipos odontológicos para o controle dessa problemática. Trata-se de um estudo do tipo experimental/laboratorial *in vitro*. Alíquotas de 2mL de *Tryptic Soy Broth* com 1% do inóculo bacteriano padronizado (10^6UFC/mL) de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foram inoculadas em cada um dos poços de placas de poliestireno de 24 poços. Em seguida, fragmentos de linha d'água (FL) de 1cm (n=48) foram transferidos para os poços das placas. A incubação foi efetuada em estufa de agitação a 37°C por 24h em 80rpm. Decorrido o período de incubação, os FL foram enxaguados com 5mL de solução salina a 0,85% por três vezes para retirada das células planctônicas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para duas placas de 24 poços contendo 2mL de água purificada do tipo II (osmose reversa) esterilizada em cada poço. Grupos experimentais com temperaturas e tempos de exposição diferentes foram avaliados: temperatura ambiente (controle) – (n=24) e a 60°C (n=24), e 30s (n=12) e 60s (n=12). As amostras dos FL foram transferidas para microtubos contendo 1mL de *Tryptic Soy Broth* e pérolas de vidro. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos por 2min e, em seguida, alíquotas de 50µL *in natura* e diluídas (diluição decimal seriada até 10^{-5}) foram semeadas em placas de Petri (60x15mm) com *Cetrimide Agar*. Após o período de incubação em estufa a 37°C por 24h, os números de unidades formadoras de colônia expressas por FL (UFC/FL) foram determinados. Além disso, as amostras dos FL foram fixadas, desidratadas, metalizadas e submetidas à análise por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados coletados foram submetidos à análise estatística empregando-se os testes de Shapiro–Wilk e *U* de Mann–Whitney por meio do software BioEstat® (versão 5.3) e nível de significância α=5%. Houve diferença entre a comparação das medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente (335.000UFC/FL) e a 60°C (2.030UFC/FL) por 30s (p=0,0005), com redução de 3logUFC/FL. Ainda, a comparação entre as medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente (173.000UFC/FL) e a 60°C (1.780UFC/FL) por 60s mostrou diferença (p=0,0047), com redução de 2logUFC/FL. A MEV demonstrou a presença de biofilme em todas as amostras analisadas, entretanto nos FL expostos à água a 60°C, os bastonetes (*P. aeruginosa*) foram evidenciados em menor quantidade e com características morfológicas atípicas. Em conclusão, a exposição do biofilme de *P. aeruginosa* formado nos FL de equipo odontológico à água em elevada temperatura reduziu a carga e alterou a morfologia bacteriana, demonstrando possível aplicabilidade na biossegurança: controle de contaminação/infecção na Odontologia.

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

ABSTRACT

DALLALANA, Erick Silva. **Water at high temperature: is its applicability for biofilm control of dental unit viable?** 2019. 48 l. Dissertation (Master of Science) – School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

In dentistry, dental unit waterlines were substrates for biofilm formation and, consequently, dispersion of this microbial contamination for distilled water to dental treatment. The objective of this study was to investigate water antibiofilm activity at high temperature against *Pseudomonas aeruginosa*, aiming at its applicability in dental unit waterlines for controlling this problem. It is an *in vitro* experimental/laboratory study. 2mL aliquots of *Tryptic Soy Broth* with 1% of standardized bacterial inoculum (10^6CFU/mL) of *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were inoculated on each one of 24-well polystyrene plates. Next, fragments of waterline (FW) of 1cm (n=48) were transferred for plates wells. The incubation was carried out in an incubator shaker at 37°C for 24h at 80rpm. After the incubation period elapsed, the FW were flushed with 5mL of saline solution at 0.85% by three times for removing planktonic cells. Subsequently, the samples were transferred to two 24-well plates containing 2mL of type II purified water (reverse osmosis) sterilized in each well. Experimental groups with different temperatures and exposition times were evaluated: room temperature (control) – (n=24) and at 60°C (n=24), and 30s (n=12) and 60s (n=12). The FW samples were transferred to microtubes containing 1mL of *Tryptic Soy Broth* and glass beads. The tubes were homogenized in an orbital shaker for 2min and, following this, diluted *in natura* 50µL aliquots (serial decimal dilution up to 10^{-5}) were seeded in Petri plates (60x15mm) with *Cetrimide Agar*. After the incubation period in chamber at 37°C for 24h, the numbers of colony-forming units expressed per FW (CFU/FW) were determined. Furthermore, the FW samples were fixed, dehydrated, metalized and submitted to analysis through scanning electron microscopy (SEM). The data collected were submitted to statistical analysis using Shapiro–Wilk and Mann–Whitney *U* tests through BioEstat® (version 5.3) software and α=5% significance level. There was a difference between the comparison of medians of bacterial loads exposed to water at room temperature (335,000CFU/FW) and at 60°C (2,030CFU/FW) for 30s (p=0.0005), with reduction of 3logCFU/FW. Moreover, the comparison between the medians of bacterial loads exposed to water at room temperature (173,000CFU/FW) and at 60°C (1,780CFU/FW) for 60s showed difference (p=0.0047), with a reduction of 2logCFU/FW. The SEM demonstrated biofilm presence on all analyzed samples, but on FW exposed to water at 60°C, the rods (*P. aeruginosa*) were evidenced in less quantity and with atypical morphological characteristics. In conclusion, the exposition of *P. aeruginosa* biofilm formed in dental unit FW to water at high temperature reduced the load and changed the bacterial morphology, demonstrating a possible applicability in biosafety: contamination/infection control in dentistry.

Keywords: Biofilms. Contamination Control. Desinfection. Dental Unit Waterline. Water Microbiology. High Temperature.

RESUMEN

DALLALANA, Erick Silva. **Agua a elevada temperatura: ¿es viable su aplicabilidad en el control de la biopelícula de equipo odontológico?** 2019. 48 h. Disertación (Maestría en Enfermería Fundamental) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

En Odontología, las líneas de agua de equipos odontológicos son sustratos para la formación de biopelícula y, consiguientemente, dispersión de esa contaminación microbiana para agua destinada al tratamiento odontológico. El objetivo de esta investigación fue chequear la actividad antibiopelícula del agua a elevada temperatura contra *Pseudomonas aeruginosa*, buscando su aplicabilidad en líneas de agua de equipos odontológicos para el control del problema. Se trata de un estudio experimental/laboratorial *in vitro*. Alícuotas de 2ml de *Tryptic Soy Broth* con 1% del inoculante bacteriano estandarizado (10^6UFC/ml) de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) fueron inoculadas en cada uno de los pocillos de placas de poliestireno de 24 pocillos. A continuación, fragmentos de línea de agua (LA) de 1cm (n=48) fueron transferidos a los pocillos de las placas. La incubación fue realizada en un invernadero de agitación a 37°C por 24h en 80rpm. Después del período de incubación, los LA fueron enjuagados con 5ml de solución salina a 0,85% por tres veces para la extracción de las células planctónicas. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a dos placas de 24 pocillos que contenían 2ml de agua purificada del tipo II (ósmosis inversa) esterilizada en cada pocillo. Se evaluaron grupos experimentales con temperaturas y tiempos de exposición variados: temperatura ambiente (control) – (n=24) y a 60°C (n=24), 30s (n=12) y 60s (n=12). Las muestras de los LA fueron transferidas a microtubos que contenían 1ml de Tryptic Soy Broth y perlas de vidrio. Los tubos fueron homogeneizados en un agitador de tubos por 2 minutos; y, posteriormente, alícuotas de 50 µL *in natura* y diluidas (dilución decimal seriada hasta 10^{-5}) fueron sembradas en placas de Petri (60x15mm) con *Cetrimide Agar*. Después del período de incubación en invernadero a 37°C por 24h, se determinaron los números de unidades formadoras de colonia expresadas por LA (UFC/LA). Además, las muestras de los LA fueron fijadas, deshidratadas, metalizadas y sometidas al análisis por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB). Los datos recogidos fueron sometidos al análisis estadístico empleando las pruebas de Shapiro-Wilk y *U* de Mann-Whitney por medio del programa informático BioEstat® (versión 5.3) y el nivel de significación α=5%. Se notó una diferencia entre la comparación de las medianas de las cargas bacterianas expuestas al agua a temperatura ambiente (335.000UFC/LA) y a 60°C (2.030UFC/LA) por 30s (p=0,0005), con una reducción de 3logUFC/ml. Además, la comparación entre las medianas de las cargas bacterianas expuestas al agua a temperatura ambiente (173.000UFC/LA) y a 60°C (1.780UFC/LA) por 60s mostró diferencia (p=0,0047), con una reducción de 2logUFC/LA. La MEB demostró la presencia de biopelícula en todas las muestras analizadas, pero, en los LA expuestos al agua a 60°C, los bastoncillos (*P. aeruginosa*) se subrayaron en menor cantidad y con características morfológicas atípicas. Se concluye que la exposición de la biopelícula de *P. aeruginosa* formada en los LA de equipo odontológico con agua a elevada temperatura ha reducido la carga y cambiado la morfología bacteriana, demostrando una posible aplicabilidad en la bioseguridad: control de contaminación/ infección en el área de Odontología.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 11
2 REVISTA DA LITERATURA..... 13
3 OBJETIVOS..... 17
3.1 Objetivo geral..... 17
3.2 Objetivos específicos..... 17
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 18
4.1 Local de estudo..... 18
4.2 Procedimentos éticos em pesquisa..... 18
4.3 Avaliação da carga bacteriana no biofilme formado em linhas de água de equipos odontológicos antes e após exposição à água em elevada temperatura..... 18
4.3.1 Linha d'água de equipo odontológico..... 18
4.3.2 Experimento bacteriológico..... 19
4.3.2.1 Padronização do inóculo bacteriano..... 19
4.3.2.2 Formação de biofilme nos fragmentos de linha d'água de equipo odontológico..... 20
4.3.2.3 Avaliação da carga bacteriana..... 20
4.3.2.4 Análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 21
4.4 Análise estatística..... 22
5 RESULTADOS..... 23
5.1 Avaliação da carga bacteriana do biofilme formado em fragmentos de linha de água de equipo odontológico..... 23
5.2 Análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 26
6 DISCUSSÃO..... 31
7 CONCLUSÃO..... 37
REFERÊNCIAS..... 38
APÊNDICES..... 47

1 INTRODUÇÃO

O profissional da área da Odontologia está exposto a todos os cinco tipos de riscos: físico (SHIM; HAN, 2018; RAMSEY; GREENOUGH; BREEZE, 2019), químico (AL-ZUBAIDI; RABEE, 2017; SHIRKHANLOO et al., 2017), biológico (KOBZA; PASTUSZKA; BRAGOSZEWSKA, 2018; SACCUCCI et al., 2017), ergonômico (CERVERA-ESPERT; PASCUAL-MOSCARDÓ; CAMPS-ALEMANY, 2018; MULIMANI et al., 2018) e mecânico ou de acidentes (GARUS-PAKOWSKA; GÓRAJSKI; GASZYŃSKA, 2018; MOODLEY; NAIDOO; WYK, 2018).

Com relação ao risco biológico, a maior fonte de contaminação microbiana na Odontologia é a boca do paciente, que apresenta um microbioma incrivelmente complexo e alberga cerca de 50 a 100 bilhões de bactérias (KRISHNAN; CHEN; PASTER, 2017) pertencentes a 772 espécies de acordo com o Banco de Dados do Microbioma Oral Humano expandido atualizado em 22 de novembro de 2017 (VERMA et al., 2018) e pode ser dispersa no ar e no meio ambiente por meio da geração de gotículas e aerossóis durante os procedimentos clínicos (KADAIFCILER; COTUK, 2014; GUPTA et al., 2014).

No início dos anos de 1950, as canetas de alta rotação supridas com água por meio das linhas d'água foram o desenvolvimento tecnológico mais marcante nos equipos odontológicos, visando o controle do aquecimento das brocas ou fresas e, portanto, a injúria térmica tecidual do paciente (NELSEN; PELANDER; KUMPULA, 1953; ESHLEMAN; SARRETT, 2013).

Essa evolução acarretou a contaminação microbiana de reservatórios e linhas d'água, conforme relatou Blake (1963), um dos primeiros investigadores desse tipo de contaminação proveniente da água de equipos odontológicos.

Contudo a água que abastece os reservatórios dos equipos odontológicos é proveniente do abastecimento público e segue no Brasil a portaria n.º 518 de 2004 do Ministério da Saúde, com limite de carga bacteriana de 500UFC/mL de água (BRASIL, 2004). Outrossim, em 1996, a *American Dental Association* (ADA) recomendou que a água não apresentasse contaminação maior que 200UFC/mL.

Atualmente, para agravar a situação da biossegurança no ambiente odontológico, os reservatórios de água e as linhas d'água dos equipos odontológicos ainda continuam propensos à formação de biofilme e, por conseguinte, uma contaminação microbiana exacerbada na água utilizada no tratamento bucal dos

pacientes (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; JI et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Segundo Del Pozo (2018), o biofilme representa um modo de proteção, que torna as células microbianas menos suscetíveis aos antimicrobianos, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis e a dispersão desses micro-organismos para formação de biofilmes em outros locais.

Devido a essa problemática do biofilme em linhas d'água dos equipos odontológicos, autores mencionaram diferentes protocolos para desinfecção com substâncias e/ou produtos comerciais ou não, com vistas ao controle da formação do biofilme (BOWEN et al., 2015; HIKAL; ZAKI; SABRY, 2015; LAL et al., 2015; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; DITOMMASO et al., 2016b; LIZON et al., 2016; PAWAR et al., 2016; FUJITA; MASHIMA; NAKAZAWA, 2017; SHAJAHAN et al., 2017; AMPORNARAMVETH et al., 2018; DITOMMASO et al., 2018; MONTEIRO, 2018; VOLGENANT; PERSOON, 2018; LIZZADRO et al., 2019).

Assim, pesquisas são necessárias para o desenvolvimento e compreensão de novos protocolos e/ou técnicas que visem o controle do biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos e, por conseguinte, a melhoria da qualidade microbiológica da água empregada no tratamento bucal dos pacientes.

2 REVISTA DA LITERATURA

Esta revista da literatura foi desenvolvida a partir de uma busca sistematizada de artigos científicos originais acerca da temperatura da água e a atividade antibiofilme contra diferentes tipos de micro-organismos, publicados no portal *PubMed da National Library of Medicine* e por meio de busca livre a partir do ano 2000.

Barbeau publicou em 2000 um artigo científico a respeito da qualidade microbiológica da água proveniente de reservatórios de equipos odontológicos. O artigo enfatizou a preocupação da comunidade científica com relação ao aumento dos casos de formação de biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos e, consequentemente, o risco de exposição dos profissionais da Odontologia e seus pacientes à contaminação microbiana. Nesse estudo, os principais micro-organismos relatados foram *Legionella pneumophila* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ademais, o abastecimento de reservatórios de equipos com águas destilada e esterilizada não foi recomendado, pois as linhas d'água, provavelmente, já apresentavam biofilme como fonte de contaminação por micro-organismos.

Borella et al. (2005) avaliaram a contaminação da água e a formação de biofilme em encanamento de hotéis, principalmente, de edifícios antigos, bem como o enfrentamento dessa problemática com agentes químico (cloro) e físico (calor). Diferentes concentrações de cloro e temperaturas da água foram avaliadas a fim de entender a formação de biofilme nos encanamentos. Hotéis com até 20 e acima de 50 anos de construção demonstraram reduzida e elevada quantidade de biofilme, respectivamente. Ainda, salientaram que a maioria dos países europeus estabelece uma temperatura da água de armazenamento de no máximo 50°C. Os resultados indicaram que o cloro pode ser prejudicial à saúde humana em decorrência da sua concentração na água proveniente da rede de abastecimento público. Além disso, a água a 60°C reduziu o biofilme nos encanamentos dos hotéis. Em conclusão, a água em elevada temperatura controlou o biofilme nos encanamentos dos hotéis, no entanto essa solução simples pode aumentar os custos e inviabilizar a sua implementação, porque há a necessidade do uso de caldeiras e misturadores, com água quente e fria para se atingir a temperatura adequada que não cause injúrias térmicas nos clientes.

Em 2007, Al-Hiyasat et al. determinaram a contaminação da água de equipos odontológicos de uma universidade da Jordânia. Cabe ressaltar que os 10 equipos eram abastecidos com água de dois reservatórios. A determinação da carga microbiana foi efetuada pela filtragem das amostras em membrana de nitrocelulose e semeadura em placas de Petri com meio de cultura. Todas as amostras de água apresentaram contaminação microbiana e o abastecimento dos reservatórios com água com baixo padrão de qualidade microbiológica pode contaminar de forma generalizada os equipos. Concluiu-se que a prevenção da contaminação da água de equipos odontológicos deve iniciar com o abastecimento dos reservatórios com água em temperatura adequada e dentro dos padrões microbiológicos aceitáveis. Uma opção para esse controle é a adição de cloro nos reservatórios dos equipos e a manutenção da temperatura da água acima de 50°C.

Coleman et al. (2008) reportaram o emprego de sistemas automatizados para a melhoria da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos. Por longos períodos e com uma intervenção humana mínima, esses sistemas automatizados demonstraram baixa deterioração dos componentes dos equipos e segurança aos profissionais da Odontologia e aos pacientes. Ressaltou-se a cautela no uso de água em elevada temperatura, sendo que entre 25 e 37°C pode haver o crescimento dos micro-organismos. Dessa maneira, o uso de água em elevada temperatura controlou a contaminação microbiana da água, bem como a formação de biofilme das linhas d'água de equipos odontológicos.

Farhat et al. (2009) utilizaram a água em elevada temperatura conjuntamente com descargas elétricas no combate de micro-organismos planctônicos e na forma de biofilme de uma rede de encanamentos em escala piloto. Os protocolos experimentais de intervenção foram embasados em ciclos de 3 dias, com as amostras em contato a 60, 70 e 80°C durante 30min. Em seguida, as descargas elétricas foram empregadas por 10, 20 e 30min. Em suma, houve diminuição inicial de 90% dos micro-organismos durante os ciclos de exposição, todavia apenas a água em elevada temperatura manteve as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

Em 2011, Kiskó e Szabó-szabó avaliaram a utilização potencial da água em elevada temperatura para o controle de biofilme. Como vantagem, a água em elevada

temperatura pode atingir locais de difícil acesso e sem uso de agentes químicos. Todavia, algumas restrições são pontuadas, como na indústria de laticínios, uma vez que a desnaturação das proteínas pode auxiliar no condicionamento das superfícies, aumentando a aderência inicial dos micro-organismos. Decorrido o período de formação dos biofilmes por 24, 48 e 168h, a água em elevada temperatura (85°C) foi mantida em contato durante intervalos de 1min. Os resultados mostraram que o local que foi aplicada a água em elevada temperatura, o biofilme não se desenvolveu plenamente, sendo necessária a fricção para a remoção total dos micro-organismos. Concluíram que apenas o uso de água em elevada temperatura não foi suficiente para remoção total do biofilme, sendo necessário o emprego complementar de agentes químicos.

Em 2015, Leoni e colaboradores abordaram os riscos e estratégias de enfrentamento da contaminação da água dos equipos odontológicos por *Legionella* spp. Em um total de 63 equipos (seringas tríplices e saídas de alta rotação) foram implementadas medidas de controle de contaminação por meio de protocolos de desinfecção contínua e periódica, bem como treinamento frequente da equipe odontológica. Os resultados mostraram que a temperatura da água influenciou na formação do biofilme nas linhas d'água. Ademais, a estratégia inicial para o controle de contaminação por *Legionella* spp. deveria ser o uso de água em temperatura acima de 50°C em conjunto com protocolos de desinfecção e treinamento dos profissionais. Diante do exposto, concluiu-se que a água em elevada temperatura controlou a formação de biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos e a contaminação da água causada por *Legionella* spp. em conjunto com outras estratégias estabelecidas nessa pesquisa.

Ditommaso et al. (2016a) investigaram a contaminação dos sistemas de distribuição de água e das linhas d'água de equipos odontológicas por *Legionella* spp. De acordo com os resultados, a contaminação inicia-se pela água das torneiras, que abastecem os reservatórios dos equipos odontológicos. Outrossim, as águas em temperaturas de 22 e 36°C, frequentemente utilizadas em consultórios odontológicos europeus, demonstraram 68 e 93% de contaminação por *Legionella* spp., respectivamente. Além disso, temperaturas mais reduzidas não inibiram a contaminação da água e a formação de biofilme nas linhas d'água. Assim, a água em

temperaturas acima do padrão utilizado pela comunidade europeia poderia controlar a contaminação por *Legionella* spp., e o monitoramento dessa bactéria realizado por meio de um bom indicador, a quantificação de bactérias heterotróficas aeróbias totais.

Em 2016, van der Kooij e colaboradores avaliaram a formação de biofilme por *L. pneumophila* em diferentes temperaturas de água. As temperaturas utilizadas foram de 37 a 47°C. Cepas de *L. pneumophila* foram cultivadas em meios de cultura de com extrato de levedura e carvão vegetal. No entanto, essas bactérias não cresceram nos biofilmes em temperaturas acima de 41°C, bem como as suas hospedeiras típicas (*Vermamoeba vermiformis*) – amebas. Ao que tudo indica, a multiplicação das amebas se faz necessária para permitir a viabilidade das cepas de *L. pneumophila* em temperatura elevada da água. Em conclusão, duas cepas de *L. pneumophila* não se multiplicaram no biofilme em temperaturas acima de 47°C devido à ausência do hospedeiro termotolerante, *V. vermiformis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar a atividade antibiofilme da água em elevada temperatura contra *Pseudomonas aeruginosa*, visando à possível aplicabilidade em linhas d'água de equipos odontológicos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a redução da carga bacteriana no biofilme formado em linhas de água de equipos odontológicos por diferentes períodos de contato da água em elevada temperatura;

- ✓ Analisar a morfologia do biofilme formado em linhas de água de equipos odontológicos por meio de microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental/laboratorial em modelo *in vitro* que atende o objetivo geral preestabelecido de investigar a atividade antibiofilme da água em elevada temperatura contra *Pseudomonas aeruginosa*, visando à aplicabilidade em linhas d'água de equipos odontológicos.

4.1 Local de estudo

O experimento microbiológico da pesquisa foi desenvolvido 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.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil pertencente ao Programa de Equipamentos Multiusuários da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – (Processo n.º 04/09320-9).

4.2 Procedimentos éticos em pesquisa

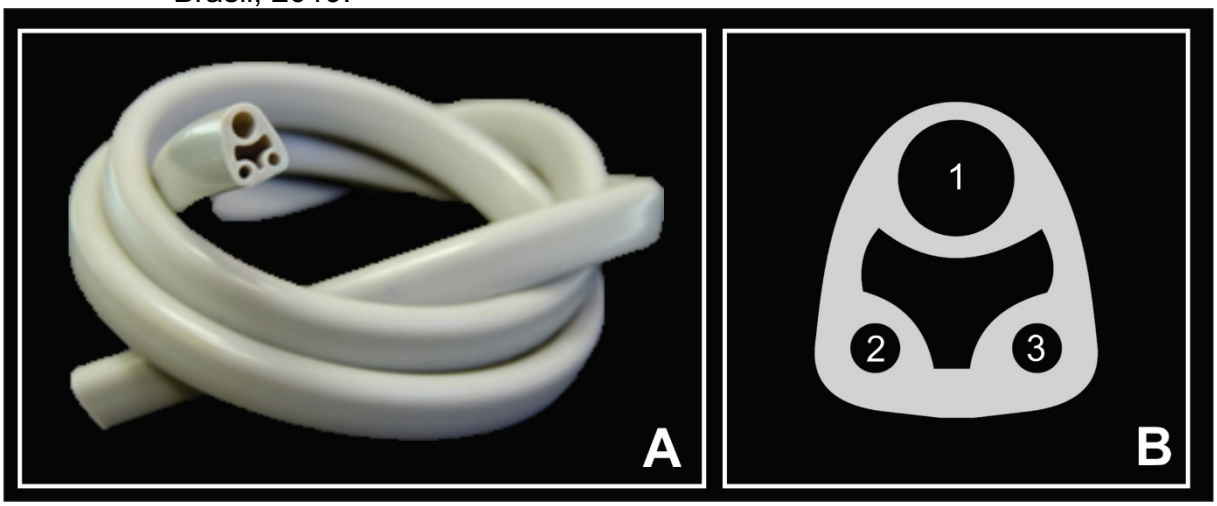
Esta pesquisa não foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, visto que se tratou de um modelo *in vitro*.

4.3 Avaliação da carga bacteriana no biofilme formado em linhas de água de equipos odontológicos antes e após exposição à água em elevada temperatura

4.3.1 Linha d'água de equipo odontológico

A linha d'água de equipo odontológico (Figura 1) empregada nesta pesquisa foi confeccionada em poliuretano (em cor cinza e temperatura de trabalho de até 60°C) e é a responsável pelo transporte da água do reservatório até as seringas tríplice e as saídas dos alta rotação, conforme as especificações do fabricante.

Figura 1 – Vista panorâmica da: **A)** linha d'água de equipo odontológico; **B)** ilustração de um corte transversal da linha d'água de equipo odontológico com as saídas de **1)** ar (3mm); **2)** ar (1mm) e **3)** água (1mm). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.



Fonte: elaborada pelo autor.

As amostras de fragmento de linha d'água dos equipos odontológicos foram cortados transversalmente (1cm) e, em seguida, longitudinalmente (saídas de 2 e 3 da Figura 1).

Os fragmentos de linha d'água foram embalados em papel grau cirúrgico e esterilizados em autoclave vertical – linha AV (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 120°C por 20min. Decorrido esse processo, as embalagens foram submetidas a secagem em forno de Pasteur (Quimis, Diadema, SP, Brasil) 60°C por 24h.

4.3.2 Experimento bacteriológico

O experimento bacteriológico foi realizado segundo os princípios básicos de assepsia em Cabine de Segurança Biológica Classe II – modelo Bio Seg 12 (Grupo VECO, Campinas, SP, Brasil).

Os fragmentos de linha d'água foram distribuídos em placas de poliestireno de 24 poços (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) com auxílio de pinça esterilizada.

4.3.2.1 Padronização do inóculo bacteriano

Cultura recente da cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foi obtida a partir da semeadura em placa Petri (15x60mm) com *Muller Hinton Agar*

(BD Difco, Sparks, MD, EUA) e incubação em estufa (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 24h.

Com auxílio de alça esterilizada, o inóculo bacteriano da placa Petri foi transferido para o tubo de ensaio (25x150mm) com 10mL de solução salina a 0,85% e pérolas de vidro. Em seguida, realizou-se a homogeneização do inóculo em agitador de tubos AP-56 (Phoenix Luferco, Araraquara, SP, Brasil) por 1min.

A padronização do inóculo bacteriano (10^8UFC/mL) foi realizada após a transferência para uma cubeta de quartzo. Em espectrofotômetro – modelo 22PC (Spectrumlab, China), a leitura da absorbância foi determinada entre 0,080 e 0,100 e em comprimento de onda de 625nm.

4.3.2.2 Formação de biofilme nos fragmentos de linha d'água de equipo odontológico

Alíquotas de 2mL do meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (Difco, Sparks, MD, EUA) com 1% do inóculo bacteriano padronizado (10^6UFC/mL) foram inoculadas em cada um dos poços de placas de poliestireno de 24 poços (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). Em seguida, os fragmentos de linha d'água (n=48) foram transferidos para os poços das placas com auxílio de pinça esterilizada. A incubação foi efetuada em estufa de agitação orbital (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 24h em rotação de 80rpm.

4.3.2.3 Avaliação da carga bacteriana

Decorrido o período de incubação, os fragmentos foram enxaguados com 5mL de solução salina a 0,85% por três vezes para retirada das células planctônicas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para duas placas de 24 poços contendo 2mL de água de água purificada do tipo II – osmose reversa (Quimis, Diadema, SP, Brasil) esterilizada. Uma das placas foi mantida à temperatura ambiente (n=24), enquanto que a outra a 60°C com auxílio de banho-maria (n=24). Para cada temperatura, dois tempos de contato das amostras foram estipulados: 30s (n=12) e 60s (n=12).

Vale salientar que o monitoramento da temperatura a 60°C foi realizado em um poço de cada placa, exclusivamente para esse propósito, com auxílio de um termostato.

As amostras dos fragmentos foram transferidas para microtubos contendo 1mL de *Tryptic Soy Broth* e pérolas de vidro. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos por 2min e, em seguida, alíquotas de 50µL *in natura* e diluídas (diluição decimal seriada até 10^{-5}) foram semeadas em placas de Petri (60x15mm) com *Cetrimide Agar* (Difco, Sparks, MD, EUA).

Após o período de incubação em estufa (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 24h, a leitura das placas foi efetuada com auxílio estereomicroscópio trinocular – modelo AQZ-DS4-TRI70 (Tecnival) e os números de unidades formadoras de colônia bacterianas expressas por fragmento de linha d'água (UFC/FL).

4.3.2.4 Análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Decorrido o período de incubação para formação do biofilme, as amostras foram transferidas para microtubos (1,5mL) contendo 1mL de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e pH 7,4, para fixação do biomaterial e material biológico (biofilme). Decorrido o período de fixação, por no mínimo 12h, as amostras foram desidratadas em série de álcoois a 15, 30, 50, 70, 95 e 100%, durante 15 minutos para cada concentração. Uma vez desidratadas, as amostras foram transferidas para microtubos (1,5mL) perfurados para secagem e armazenados em contêiner com sílica, a fim de se evitar a incorporação de água.

As amostras foram fixadas em um suporte para secagem com CO_2, no ponto crítico, em aparelho Bal-Tec CPD 050 (Critical Point Dryer – Fürstentum – Liechtenstein). Em seguida, procedeu-se à montagem das amostras em suportes (stubs) metálicos e à metalização com ouro (20kV, 15mA, 2min) para torná-las condutoras.

A metalização das amostras com ouro e a avaliação dos biofilmes formados nos fragmentos de linha d'água de equipos odontológicos foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP pertencente ao Programa de Equipamentos Multiusuários da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – (Processo n.º 04/09320-9).

As amostras foram submetidas à análise por meio do microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50 com contrastes topográfico e composicional, alto vácuo e baixo vácuo.

4.4 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística empregando-se os testes de Shapiro–Wilk e *U* de Mann–Whitney por meio do software BioEstat® (versão 5.3) e nível de significância α=5%.

5 RESULTADOS

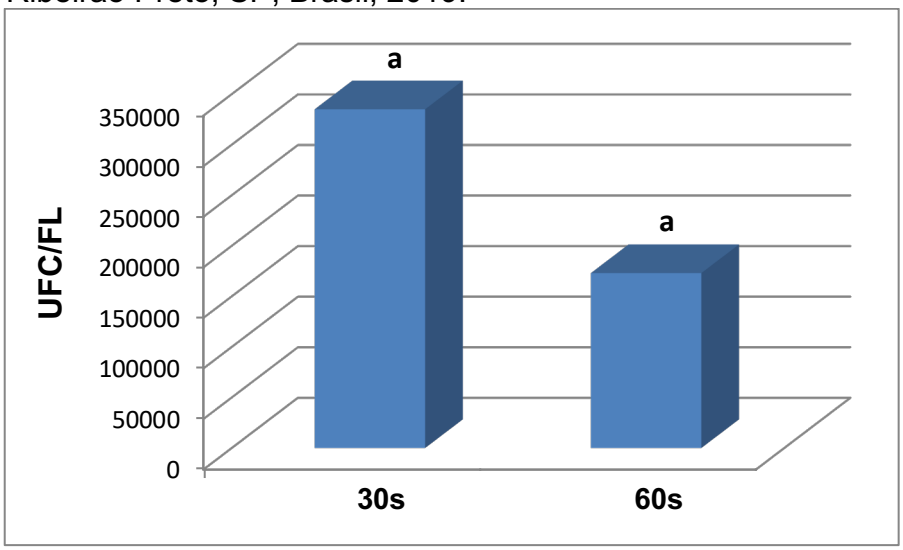
Os resultados foram apresentados nesta pesquisa considerando os aspectos relacionados à avaliação da carga bacteriana do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado nas superfícies dos fragmentos de linha d'água (FL) de equipo odontológico, bem como a análise da morfologia do biofilme por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.1 Avaliação da carga bacteriana do biofilme formado em fragmentos de linha de água de equipo odontológico

Os resultados das medianas das cargas bacterianas das amostras de FL de equipo odontológico, que foram expostas à água à temperatura ambiente (controle) por 30 e 60s demonstraram 335.000UFC/FL / 5,0logUFC/FL (72.000 a 212.000.000UFC/FL / 4,9 a 8,3logFC/FL) e 173.000UFC/FL (10.000 a 3.800.000 UFC/FL / 4,0 a 6,6logFC/FL), respectivamente (Figura 2 e Apêndices A e B).

Assim, não houve diferença entre as medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente com relação aos diferentes períodos de 30 e 60s (p=0,2727).

Figura 2 – Comparação entre as medianas das cargas bacterianas de *P. aeruginosa* das amostras de fragmentos de linhas d'água (FL) de equipo odontológico expostas à água à temperatura ambiente (controle). As letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos experimentais (p=0,2727). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.

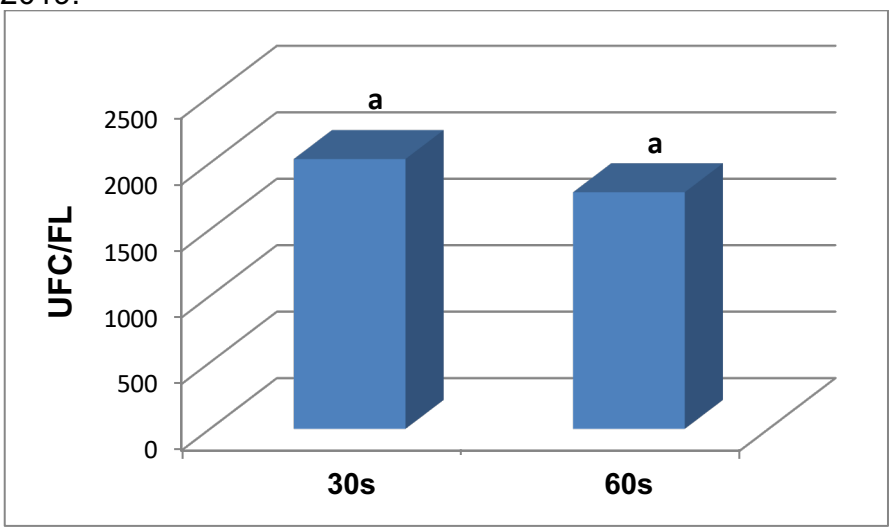


Fonte: elaborada pelo autor.

De acordo com a Figura 3 e Apêndices A e B, as medianas das cargas bacterianas das amostras de FL de equipo odontológico expostas à água a 60°C foram de 2.030UFC/FL / 4,0logFC/FL (0 a 496.000.000UFC/FL / 2,0 a 8,7logFC/FL) por 30s e de 1.780UFC/FL / 3,0logFC/FL (0 a 82.000.000UFC/FL / 1,3 a 7,9logFC/FL) por 60s.

Dessa forma, apesar de ter havido uma redução da mediana da carga bacteriana de 250UFC/FL (12,3%), não houve diferença (p=0,5254) nem demonstração de redução logarítmica em UFC/FL.

Figura 3 – Comparação entre as medianas das cargas bacterianas de *P. aeruginosa* das amostras de fragmentos de linhas d'água (FL) de equipo odontológico expostas à água a 60°C. As letras iguais indicam que não há diferença entre os grupos experimentais (p=0,5254). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.

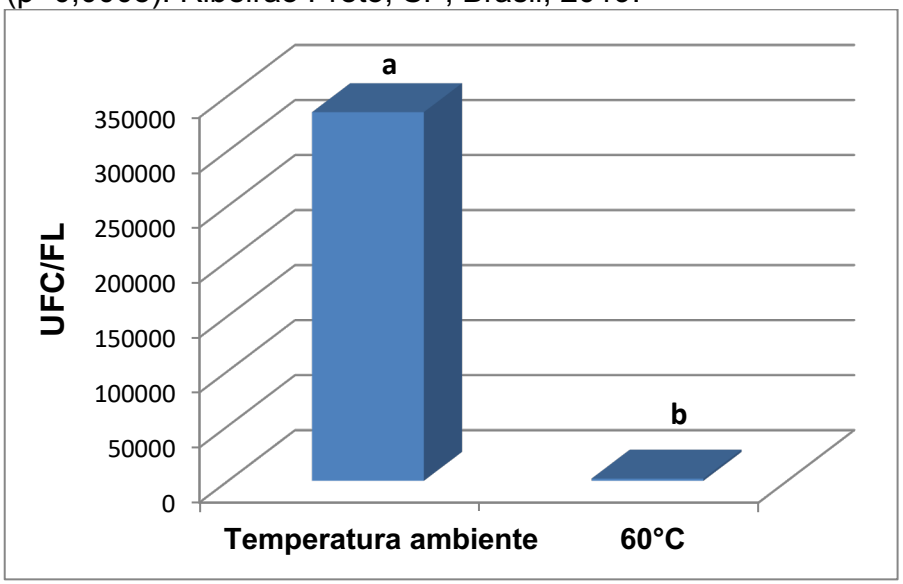


Fonte: elaborada pelo autor.

Segundo a Figura 4 e Apêndices A e B, as medianas das cargas bacterianas de *P. aeruginosa* das amostras de FL de equipo odontológico expostas à água à temperatura ambiente (controle) e a 60°C durante 30s foram de 335.000UFC/FL / 5,0logFC/FL (72.000 a 212.000.000UFC/FL / 4,9 a 8,3logFC/FL) e 2.030UFC/FL / 4,0logFC/FL (0 a 496.000.000UFC/FL / 2,0 a 8,7logFC/FL), respectivamente.

Dessa maneira, houve diferença entre a comparação das medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente (5logUFC/FL) e a 60°C (4logUFC/FL) por 30s (p=0,0005), com redução de 1logUFC/FL.

Figura 4 – Comparação entre as medianas das cargas bacterianas de *P. aeruginosa* das amostras de fragmentos de linhas d'água (FL) de equipo odontológico expostas à água à temperatura ambiente (controle) e a 60°C por 30s. As letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais (p=0,0005). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.

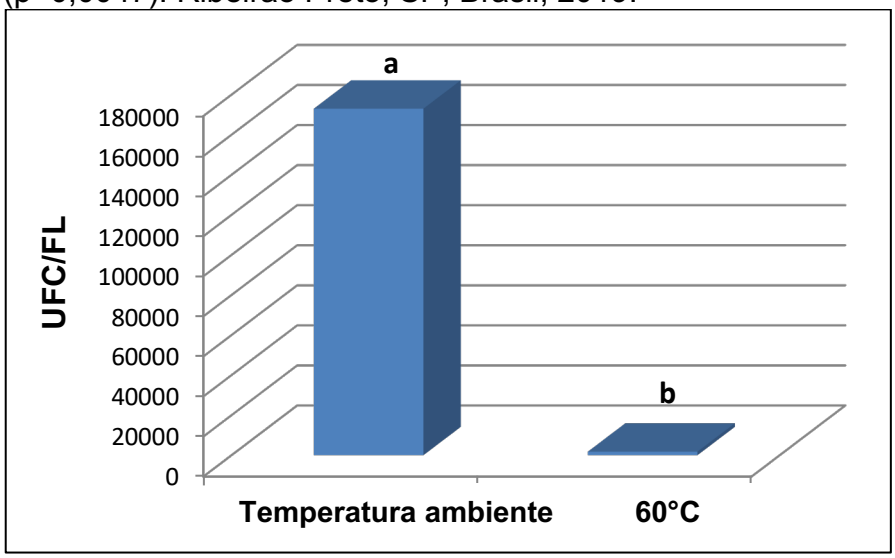


Fonte: elaborada pelo autor.

A mediana da carga bacteriana de *P. aeruginosa* das amostras de FL de equipo odontológico expostas à água à temperatura ambiente (controle) por 60s foi de 173.000UFC/FL / 4,5logFC/FL (10.000 a 3.800.000UFC/FL / 4,0 a 6,6logFC/FL), enquanto que a 60°C por 60s foi de 1.780UFC/FL / 3,0logFC/FL (0 a 82.000.000UFC/FL / 1,3 a 7,9logFC/FL) – (Figura 5 e Apêndices A e B).

Então, a comparação entre as medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente (4,5logUFC/FL) e a 60°C (3logUFC/FL) por 60s mostrou diferença (p=0,0047), com redução de 1,5logUFC/FL.

Figura 5 – Comparação entre as medianas das cargas bacterianas de *P. aeruginosa* das amostras de fragmentos de linhas d'água (FL) de equipo odontológico expostas à água à temperatura ambiente (controle) e a 60°C por 60s. As letras diferentes indicam que há diferença entre os grupos experimentais (p=0,0047). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.



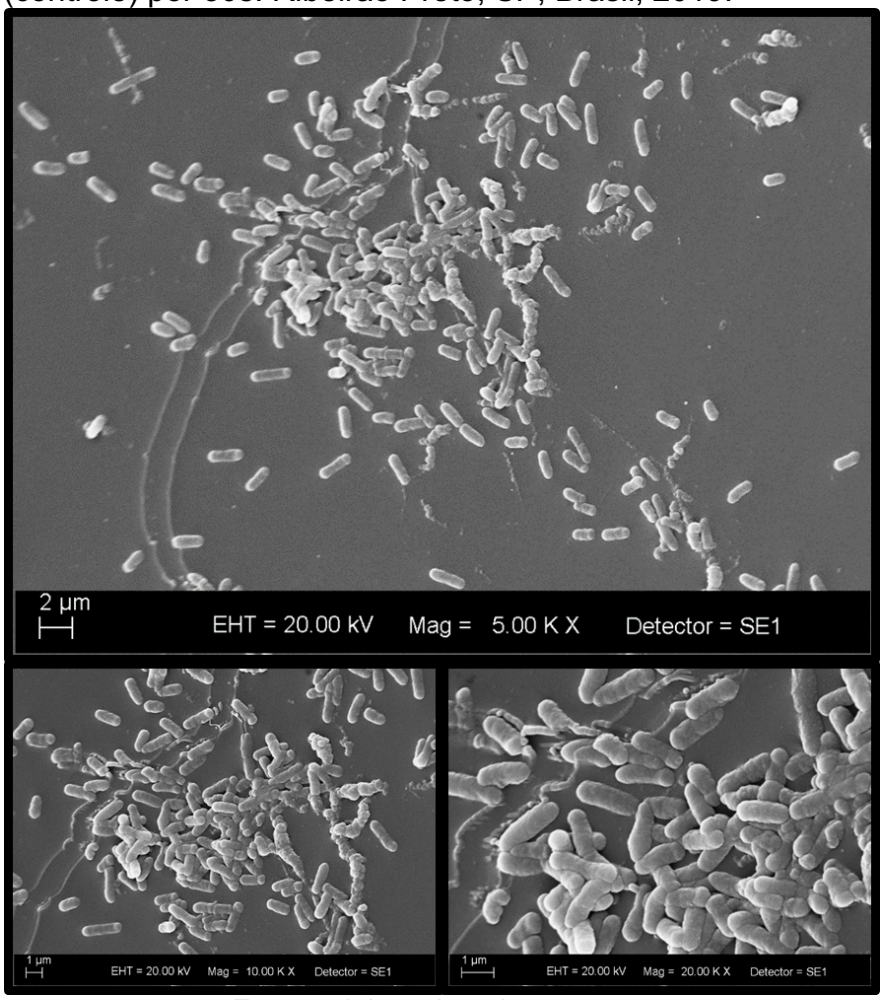
Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Análise do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os resultados da análise do biofilme formado nos FL de equipo odontológico por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram exibidos nas Figuras 6 a 9. Todas as amostras demonstraram formação de biofilme por *P. aeruginosa*.

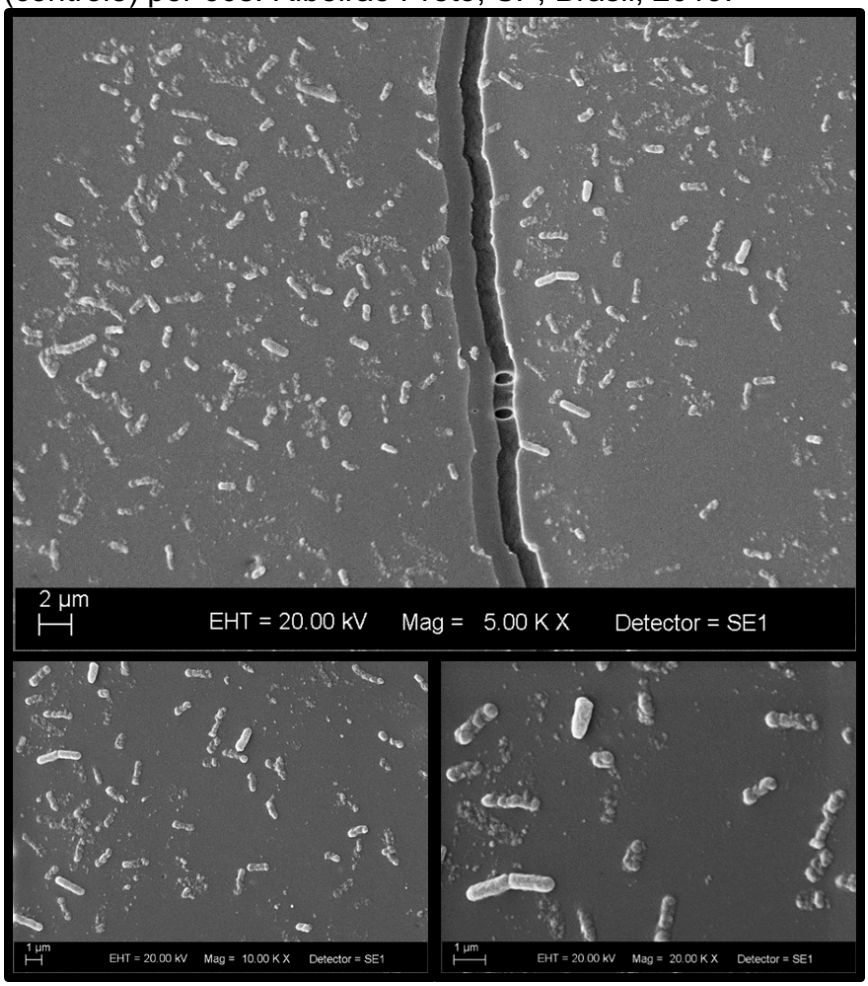
As Figuras 6 e 7 com as eletromicrografias (5.000x, 10.000x e 20.000x) exibiram biofilmes constituídos com numerosos bastonetes (*P. aeruginosa*), que foram expostos à água à temperatura ambiente (controle) por 30 e 60s, respectivamente. Por outro lado, uma menor quantidade de bactérias com características morfológicas atípicas foi identificada nas amostras de FL expostas à água a 60°C por 30s (Figura 8) e 60s (Figura 9).

Figura 6 – Eletromicrografia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do fragmento de linha de água (FL) de equipo odontológico com a formação de biofilme por *P. aeruginosa* exposto à água à temperatura ambiente (controle) por 30s. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.



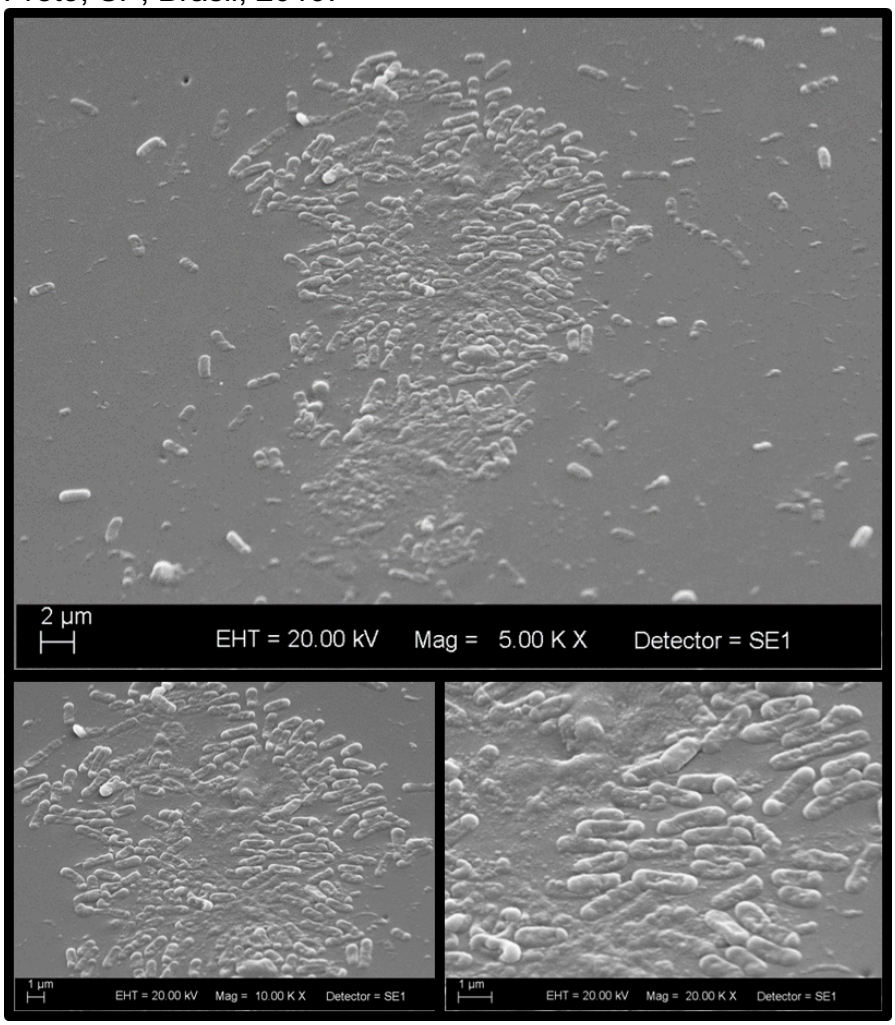
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 7 – Eletromicrografia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do fragmento de linha de água (FL) de equipo odontológico com a formação de biofilme por *P. aeruginosa* exposto à água à temperatura ambiente (controle) por 60s. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.



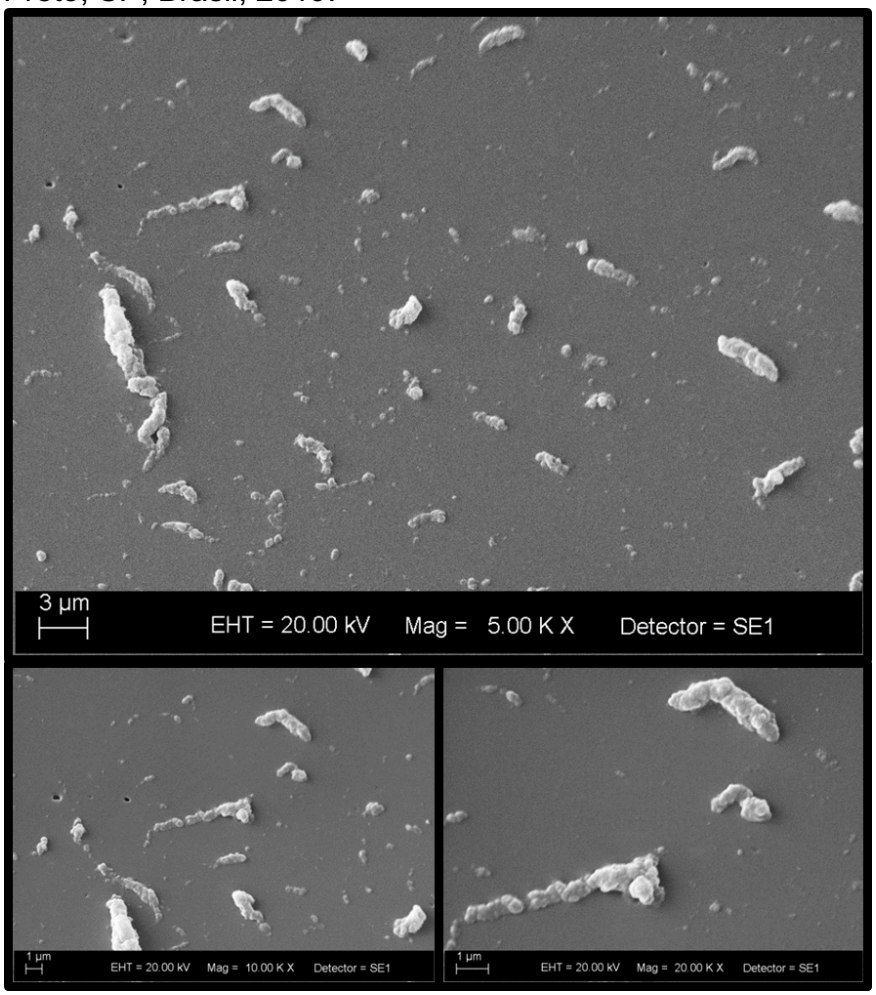
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 8 – Eletromicrografia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do fragmento de linha de água (FL) de equipo odontológico com a formação de biofilme por *P. aeruginosa* exposto à água a 60°C por 30s. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 9 – Eletromicrografia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do fragmento de linha de água (FL) de equipo odontológico com a formação de biofilme por *P. aeruginosa* exposto à água a 60°C por 60s. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.



Fonte: elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Com relação ao enfrentamento da problemática do biofilme em linhas d'água dos equipos odontológicos, a literatura científica tem sinalizado o uso de diferentes agentes químicos (BOWEN et al., 2015; HIKAL; ZAKI; SABRY, 2015; LAL et al., 2015; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; DITOMMASO et al., 2016b; LIZON et al., 2016; PAWAR et al., 2016; FUJITA; MASHIMA; NAKAZAWA, 2017; SHAJAHAN et al., 2017; AMPORNARAMVETH et al., 2018; DITOMMASO et al., 2018; MONTEIRO, 2018; VOLGENANT; PERSOON, 2018; LIZZADRO et al., 2019).

Todavia, apesar das vantagens inerentes dessas substâncias e/ou produtos para a manutenção do ambiente biologicamente seguro na Odontologia, há desvantagens relacionadas à toxicidade e desequilíbrio do ecossistema ambiental a curto ou longo prazo, que podem ser contornadas pela substituição por agentes físicos, como as ondas acústicas (PANTANELLA et al., 2019) e a água em elevada temperatura (AL-HIYASAT et al., 2007; COLEMAN et al., 2008; LEONI et al., 2015; DITOMMASO et al., 2016a; VAN DER KOOIJ et al., 2016).

Desde a época de Pasteur, diversos relatos quanto ao controle microbiano pela implementação de processos de pasteurização e de elevadas temperaturas (água em ebulição) foram reportados. No entanto, pesquisas recentes são escassas acerca da eficácia de tais técnicas, particularmente no que diz respeito à desinfecção de alto nível de artigos odonto-médico-hospitalares (WINTHROP; HOMESTEAD et al., 2012).

O calor úmido por meio da água em elevada temperatura é um agente físico que causa a morte microbiana por meio da termocoagulação das proteínas (TRABULSI et al., 2008; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Em encanamento de hotéis, a água em elevada temperatura controlou o biofilme, mas essa solução simples pode aumentar os custos e inviabilizar a sua implementação, porque há a necessidade do uso de caldeiras e misturadores, com água quente e fria para se atingir a temperatura adequada que não cause injúrias térmicas nos clientes (BORELLA et al., 2005).

Em 2007, Al-Hiyasat et al. relataram o controle de contaminação por meio da adição de cloro nos reservatórios dos equipos odontológicos e a manutenção da temperatura da água do reservatório dos equipos acima de 50°C. Entretanto,

conforme Coleman et al. (2008), a temperatura da água entre 25 e 37°C pode permitir o crescimento microbiano na água.

Com o intuito de reforçar a importância da manutenção da qualidade microbiológica da água para a manutenção do ambiente biologicamente seguro, em fevereiro de 2011, uma mulher de 82 anos de idade foi internada em uma unidade de terapia intensiva com febre e dificuldade respiratória. A radiografia de tórax mostrou várias áreas do pulmão afetadas pela infecção, e agente etiológico diagnosticado como *Legionella pneumophila*. Infelizmente a paciente desenvolveu um choque séptico fulminante e irreversível e morreu 2 dias mais tarde. Uma investigação minuciosa foi instaurada, e esse foi o primeiro relato confirmado de legionelose ou febre de Pontiac relacionada à água e linha d'água de equipo odontológico como fonte/causa de infecção (RICCI et al., 2012). Ainda, o mais preocupante tem sido o relato da literatura científica da elevada prevalência de *Legionella* spp. na água e linhas d´água de equipos odontológicos (BARBEAU, 2000; BORELLA et al., 2005; O'DONNELL et al., 2011; PASQUARELLA et al., 2012; LEONI et al., 2015; DITOMMASO et al., 2016a; DITOMMASO et al., 2016b; VAN DER KOOIJ et al., 2016), que pode ser monitorada por meio de um bom indicador, a quantificação de bactérias heterotróficas aeróbias totais (DITOMMASO et al., 2016a).

Cabe ressaltar, que na análise de rotina, não é recomendada a avaliação de micro-organismos específicos como *Legionella* spp. ou *Pseudomonas* spp., exceto se houver uma investigação de surtos de doenças infectocontagiosas transmitidas pela água (KOHN et al., 2003; SEHULSTER et al., 2003).

De acordo com Leoni et al. (2015), a estratégia inicial para o controle de contaminação por *Legionella* spp. deveria ser o uso de água em temperatura acima de 50°C em conjunto com protocolos de desinfecção e treinamento dos profissionais, salientando que não houve o crescimento de duas cepas de *L. pneumophila* no biofilme em temperaturas acima de 47°C devido à ausência do hospedeiro termotolerante, *V. vermiformis* (VAN DER KOOIJ et al., 2016).

Nesta pesquisa, apesar de não termos trabalhado com *Legionella* spp., a atividade antibiofilme da água em elevada temperatura (60°C) foi realizada contra *Pseudomonas aeruginosa*, visando à possível aplicabilidade em linhas d'água de equipos odontológicos.

P. aeruginosa são bastonetes gram-negativos não fermentadores de glicose, de vida livre e ubiquitários (isolados no solo, nas águas doce e salgada, nos vegetais,

nos animais, nos alimentos e em ambientes domésticos e de assistência à saúde). São bactérias versáteis, que podem se adaptar a uma gama de habitats e até crescer em água purificada (osmose reversa e destilada). Em indivíduos saudáveis, ocasionalmente, causam infecção, todavia em imunocomprometidos são os principais agentes etiológicos oportunistas relacionados à infecção hospitalar. A sua importância clínica decorre da dificuldade de se controlar o processo de infecção com contínuos fracassos terapêuticos, em virtude dos fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos dessa bactéria (TRABULSI et al., 2008; MENA; GERBA, 2009; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Em 1987, Martin identificou *P. aeruginosa* de abscessos bucais de dois pacientes com câncer submetidos ao tratamento odontológico. Vale destacar que as bactérias dos pacientes e das amostras de água dos equipos odontológicos produziram o mesmo tipo de piocianina (pigmento). No entanto, essa característica fenotípica bacteriana específica não foi cabal para relacionar as cepas de *P. aeruginosa* provenientes da água dos equipos odontológicos com as infecções dos pacientes.

Diversos autores relataram em estudos, *P. aeruginosa* em amostras de água de equipos odontológicos (MARTIN, 1987; BARBEAU, 2000; AL-HIYASAT et al., 2007; ABDALLAH; KHALIL, 2011; O'DONNELL et al., 2011; KRAMER et al., 2012; AGAHI et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; ABDOUCHAKOUR et al., 2015; LIZON et al., 2016; VINCENT et al., 2017; LAL; RAVINDRA; BISWAL, 2018). Outrossim, o uso dessa bactéria em sistemas simulados de contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos foi reportado em outros trabalhos científicos (GAWANDE et al., 2008; ORRÙ et al., 2010; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; MONTEIRO, 2018).

Cabe destacar Al-Hiyasat et al. (2007), que mencionaram, no início do expediente de trabalho e antes do atendimento dos pacientes, a presença de *P. aeruginosa* em 86,7% dos equipos odontológicos.

Segundo Vincent et al. (2017), cepas de *P. aeruginosa* provenientes de linhas d'água de equipos odontológicos apresentaram características impressionantes quanto à colonização eficiente de diferentes ambientes e, assim, uma adaptação genômica rápida com a aquisição de elementos genéticos móveis para o aumento do conjunto de genes disponíveis, bem como a exclusão de genes dispensáveis.

Segundo Spinks et al. (2006), a faixa de temperatura de 55 a 65°C foi capaz de eliminar enterobactérias e, dessa maneira, inferiram que a temperatura da água proveniente do sistema de abastecimento público deveria ser no mínimo de 60°C.

Apesar da redução inicial de 90% dos micro-organismos durante os ciclos de exposição da água em elevada temperatura em uma unidade simulação de um sistema de água quente em escala piloto (FARHAT et al., 2009), em 2011, Kiskó e Szabó-szabó concluíram que apenas o uso de água em elevada temperatura (85°C) não foi suficiente para remoção total do biofilme, sendo necessário o emprego complementar de agentes químicos.

Conforme Winthrop e Homestead (2012), a desinfecção de alto nível de um dispositivo de atendimento domiciliar reduziu a carga bacteriana de mais de 6,3logUFC (10min) e 6,8logUFC (15min) após a exposição à água a 95°C (em ebulição).

No presente estudo, houve diferença entre a comparação das medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente (335.000UFC/FL / 5,0logUFC/FL) e a 60°C (2.030UFC/FL / 4,0logUFC/FL) por 30s (p=0,0005) – Figura 4 e Apêndices A e B, com redução de 1logUFC/FL. Ainda, a comparação entre as medianas das cargas bacterianas expostas à água à temperatura ambiente (173.000UFC/FL / 4,5logUFC/FL) e a 60°C (1.780UFC/FL / 3,0logUFC/FL) por 60s mostrou diferença (p=0,0047) – Figura 5 e Apêndices A e B, com redução de 1,5logUFC/FL. Ademais, a MEV demonstrou a presença de biofilme em todas as amostras analisadas, entretanto nos fragmentos de linha d'água expostos à água a 60°C, os bastonetes (*P. aeruginosa*) foram evidenciados em menor quantidade e com características morfológicas atípicas (Figuras 6 a 9) decorrentes do processo de termocoagulação das proteínas bacterianas ocasionada pela água em elevada temperatura.

Extrapolando nossos resultados para a realidade do consultório ou clínica odontológica, a água em elevada temperatura (60°C) poderia abastecer os reservatórios dos equipos e dessa forma permitir que a drenagem ou *flush* de água nas seringas tríplices e saídas dos alta rotação fosse efetuada antes do início e no final do expediente, bem como entre o atendimento dos pacientes por no mínimo 20 a 30s (ADA, 1996; CDC, 1993). Embora o *flush* não remova o biofilme formado nas linhas d'água dos equipos, ele pode reduzir temporariamente a contaminação microbiana da água, bem como retirar fluidos bucais que por ventura tenham entrado

via refluxo da boca dos pacientes. Autores relataram efeitos positivos desse procedimento (WIRTHLIN; MARSHALL Jr., 2001; COBB et al., 2002; KETTERING et al., 2002; AL-HIYASAT et al., 2007; MONTEIRO et al., 2018; MONTEIRO, 2018).

Entretanto, um questionamento veio à tona durante o desenvolvimento desta pesquisa: a água em elevada temperatura poderia causar algum tipo de dano nas linhas d'água dos equipos e/ou lesão na mucosa bucal dos pacientes durante o tratamento odontológico?

Em resposta a essa pergunta, decidimos trabalhar com a temperatura da água a 60°C por 30 e 60s, porque:

- ✓ A linha d'água de equipo odontológico (Figura 1) empregada nesta pesquisa foi confeccionada em poliuretano e temperatura de trabalho de até 60°C, conforme as especificações do fabricante;

- ✓ Os tempos de contato foram reduzidos, embasados no *flush* de água dos equipos e na praticidade para realização do procedimento antes do início e no final do expediente, bem como entre o atendimento dos pacientes (ADA, 1996; CDC, 1993). Além disso, o calor úmido gerado pela água em elevada temperatura pode ocasionar a termocoagulação das proteínas dos micro-organismos presentes no biofilme e, por consequência causar o aumento do condicionamento da superfície das linhas d'água, iniciando o processo de formação do biofilme;

- ✓ A água em elevada temperatura não seria utilizada diretamente na boca do paciente, mas se esse fato ocorresse por acidente, em analogia com as bebidas quentes, como o chá, o chocolate e o café, que são servidas entre 71,1 e 85°C podendo causar lesões bucais, decidimos pelo uso de uma temperatura menor (60°C), sendo que a literatura científica reportou o consumo de café à temperatura de 57,8°C por ter reduzido o risco de lesões bucais e melhorado a satisfação do cliente quanto ao consumo dessa bebida (BROWN; DILLER, 2008).

Por outro lado, como limitações da nossa pesquisa, reportamos a utilização de apenas uma cepa bacteriana (*P. aeruginosa*) em um modelo experimental *in vitro*, visando simular a formação de biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos, que na realidade é constituído de diferentes tipos de micro-organismos.

Em suma, a abordagem científica entre microbiologia, física e biossegurança: controle de contaminação/infeção na Odontologia permitiu o avanço do conhecimento no que tange à formação de biofilme por *P. aeruginosa* em linha d'água de equipo odontológico, bem como a aplicabilidade da atividade antibiofilme da água em elevada temperatura.

7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, concluímos que:

- ✓ É viável a aplicabilidade da água em elevada temperatura (60°C) por 30s no controle do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado em linhas d'água de equipos odontológicos;

- ✓ A água em temperatura elevada (60°C) pode ser utilizada para redução da carga bacteriana por apenas 30s;

- ✓ A água em alta temperatura (60°C) pode ser empregada para o controle da quantidade de bactérias com características morfológicas atípicas no biofilme;

- ✓ Pesquisas futuras são necessárias para avaliar o *flush* de água em elevada temperatura das seringas tríplices e das saídas dos alta rotação antes do início e no final do expediente, bem como entre o atendimento dos pacientes por 30s.

REFERÊNCIAS[1]

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.

ABDOUCHAKOUR, F.; DUPONT, C.; GRAU, D.; AUJOULAT, F.; MOURNETAS, P.; MARCHANDIN, H.; PARER, S.; GIBERT, P.; VALCARCEL, J.; JUMAS-BILAK, E. Pseudomonas aeruginosa and Achromobacter sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 21, p. 7509-24, 2015.

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.

AL-HIYASAT, A. S.; MA'AYEH, S.Y.; HINDIYEH, M.; KHADER, Y. S. The presence of Pseudomonas aeruginosa in the dental unit waterline systems of teaching clinics. **International Journal of Dental Hygiene,** v**.** 5, n. 1, p. 36-44, 2007.

AL-ZUBAIDI, E. S.; RABEE, A. M. The risk of occupational exposure to mercury vapor in some public dental clinics of Baghdad city, Iraq. **Inhalation Toxicology**, v. 29, n. 9, p. 397-403, 2017.

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.

AMPORNARAMVETH, R. S.; AKEATICHOD, N.; LERTNUKKHID, J.; SONGSANG, N. Application of D-Amino Acids as Biofilm Dispersing Agent in Dental Unit Waterlines. **International Journal of Dentistry**, v. 14, p. 7, 2018.

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.

BARBEAU, J. Waterborne biofilms and dentistry: the changing face of infection control. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 66, p. 539-41, 2000.

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

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.

BORELLA, P.; MONTAGNA, M. T.; STAMPI, S.; STANCANELLI, G.; ROMANO-SPICA, V.; TRIASSI, M.; MARCHESI, I.; BARGELLINI, A.; TATÒ, D.; NAPOLI, C.; ZANETTI, F.; LEONI, E.; MORO, M.; SCALTRITI, S.; D'ALCALÀ, G. R.; SANTARPIA, R.; BOCCIA, S. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5805-5813, 2005.

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.

BROWN, F.; DILLER, K. R. Calculating the optimum temperature for serving hot beverages. **Burns**, v. 34, n. 5, p. 648-54, ago. 2008.

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.

CERVERA-ESPERT, J.; PASCUAL-MOSCARDÓ, A.; CAMPS-ALEMANY, I. Wrong postural hygiene and ergonomics in dental students of the University of Valencia (Spain) (part I). **European Journal of Dental Education**, v. 22, n. 1, p. 48-56, 2018.

COBB, C. M.; MARTEL, C. R.; McKNIGHT, S. A.; PASLEY-MOWRY, C.; FERGUSON, B. L.; WILLIAMS, K. How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? **Journal of Dental Education**, v. 66, n. 4, p. 549-555, 2002.

COLEMAN, D. C.; O'DONNELL, M. J.; SHORE, A. C.; SWAN, J.; RUSSELL, R. J. The role of manufacturers in reducing biofilms in dental chair waterlines. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 9, p. 701-11, set. 2007.

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.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DITOMMASO, S.; GIACOMUZZI, M.; RICCIARDI, E.; GARBUIO, R.; ZOTTI, C. M. The role of chemical products at low doses in preventing the proliferation of bacteria in dental unit waterlines: the ICX(®) experience. **Journal Water Health**, v. 16, n. 1, p. 150-158, 2018.

DITOMMASO, S.; GIACOMUZZI, M.; RICCIARDI, E.; ZOTTI, C. Cultural and molecular evidence of Legionella spp. colonization in dental unit waterlines: which is the best method for risk assessment? **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 2, p. 211, 2016a.

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, 2016b.

ESHLEMAN, J. R.; SARRETT, D. C. How the development of the high-speed turbine handpiece changed the practice of dentistry. 1953. **The Journal of the American Dental Association**, v.144, p. 29S-32S, 2013.

FARHAT, M.; TROUILHÉ, M. C.; BRIAND, E.; MOLETTA-DENAT, M.; ROBINE, E.; FRÈRE, J. Development of a pilot-scale 1 for Legionella elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 1073-1082, 2010.

FREITAS, V. R.; SAND, V. S. T.; SIMONETTI, A. B. Formação in vitro de biofilme por Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista Odontológica UNESP**, v. 39, n. 4, p. 193-200, 2010.

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.

GARUS-PAKOWSKA, A.; GÓRAJSKI, M.; GASZYŃSKA, E. Occupational Safety and Hygiene of Dentists from Urban and Rural Areas in Terms of Sharp Injuries: Wound Structure, Causes of Injuries and Barriers to Reporting-Cross-Sectional Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health,** v. 4, n. 8, p. 1741, 2018.

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.

GUPTA, G.; MITRA, D.; ASHOK, K. P.; GUPTA, A.; SONI, S.; AHMED, S.; ARYA, A. Efficacy of preprocedural mouth rinsing in reducing aerosol contamination produced by ultrasonic scaler: a pilot study. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 4, p. 562-8, 2014.

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.

JI, X. Y.; FEI, C. N.; ZHANG, Y.; LIU, J.; LIU, H.; SONG, J. Three key factors influencing the bacterial contamination of dental unit waterlines: a 6-year survey from 2012 to 2017. **International Dental Journal**, 2018.

KADAIFCILER, D. G.; COTUK, A. Microbial contamination of dental unit waterlines and effect on quality of indoor air. **Environmental Monitoring and Assessment,** v. 186, n. 6, p. 3431-44, 2014.

KETTERING, J. D.; STEPHENS, J. A.; MUNOZ-VIVEROS, C. A.; NAYLOR, W. P. Reducing bacterial counts in dental unit waterlines: tap waters vs. distilled water. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 3, n. 3, p. 1-11, 2002.

KISKÓ, G.; SZABÓ-SZABÓ, O. Biofilm removal of Pseudomonas strains using hot water sanitation. **Acta Universitatis Sapientiae**, v. 4, p. 69-79, 2011.

KOBZA, J.; PASTUSZKA, J. S.; BRAGOSZEWSKA, E. Do exposures to aerosols pose a risk to dental professionals? **Occupational Medicine**, v. 68, n. 7, p. 454-458, 2018.

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.

KOHN, W. G.; COLLINS, A. S.; CLEVELAND, J. L.; HARTE, J. A.; EKLUND, K. J.; MALVITZ, D. M.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Guidelines for infection control in dental health-care settings--2003. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 52, n. RR-17, p.1-61, 19 dez. 2003.

KRISHNAN, K.; CHEN, T.; PASTER, B. J. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. **Oral diseases**, v. 3, n. 3, p. 276-286, 2017.

LAL, B.; RAVINDRA, K.; BISWAL, M. Appraisal of microbial contamination of dental unit water systems and practices of general dental practitioners for risk reduction. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 33, p. 33566-33572, 2018.

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.

LEONI, E.; DALLOLIO, L.; STAGNI, F.; SANNA, T.; D'ALESSANDRO, G.; PIANA, G. Impact of a risk management plan on Legionella contamination of dental unit water. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 3, p. 2344-2358, 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.

LIZZADRO, J.; MAZZOTTA, M.; GIROLAMINI, L.; DORMI, A.; PELLATI, T.; CRISTINO, S. Comparison between Two Types of Dental Unit Waterlines: How Evaluation of Microbiological Contamination Can Support Risk Containment. **International Journal of Environmental Research and Public Health,** v. 16, n. 3, p. E328, 2019.

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.

MARTIN, M. V. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. **British Dental Journal,** v. 163, n. 5, p. 152-4, 1987.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 201, p. 71-115, 2009.

MONTEIRO, R. M.; MARQUES, D. M.; DOMINGUES, P. C. A.; OLIVEIRA, V. C.; MACEDO, A. P.; RAZABONI, A. M.; WATANABE, E. Evaluation of a protocol for reducing the microbial contamination of dental unit water. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 31, n. 3, p. 138-143, 2018.

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

MOODLEY, R.; NAIDOO, S.; WYK, J. V. The prevalence of occupational health-related problems in dentistry: A review of the literature. **Journal of Occupational Health**, v. 60, n. 2, p. 111-125, 2018.

MULIMANI, P.; HOE, V. C.; HAYES, M. J.; IDICULLA, J. J.; ABAS, A. B.; KARANTH, L. Ergonomic interventions for preventing musculoskeletal disorders in dental care practitioners. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 10, 2018.

NELSEN, R. J.; PELANDER, C. E.; KUMPULA, J. W. Hydraulic turbine contra-angle handpiece. **Journal of the American Dental Association,** v. 47, n. 3, p. 324-9, 1953.

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.

PANTANELLA, F.; SCHIPPA, S.; SOLIMINI, A.; ROSA, L.; BETTUCCI, A.; BERLUTTI, F. Efficacy of acoustic waves in preventing Streptococcus mutans adhesion on dental unit water line. **Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità**, v. 31, n. 2, p. 109-116, mar./abr. 2019.

PASQUARELLA, C.; VERONESI, L.; NAPOLI, C.; CASTIGLIA, P.; LIGUORI, G.; RIZZETTO, R.; TORRE, I.; RIGHI, E.; FARRUGGIA, P.; TESAURO, M.; TORREGROSSA, M. V.; MONTAGNA, M. T.; COLUCCI, M. E.; GALLÈ, F.; MASIA, M. D.; STROHMENGER, L.; BERGOMI, M.; TINTERI, C.; PANICO, M.; PENNINO, F.; CANNOVA, L.; TANZI, M. Microbial environmental contamination in Italian dental clinics: A multicenter study yielding recommendations for standardized sampling methods and threshold values. **Science of the Total Environment**, v. 420, p. 289-99, 2012.

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.

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.

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.

RAMSEY, R.; GREENOUGH, J.; BREEZE, J. Noise-induced hearing loss in the military dental setting: a UK legislative perspective. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, p. jramc-2018-001150, 2019.

RICCI, M. L.; FONTANA, S.; PINCI, F.; FIUMANA, E.; PEDNA, M. F.; FAROLFI, P.; SABATTINI, M. A.; SCATURRO, M. Pneumonia associated with a dental unit waterline. **Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 684, 2012.

SACCUCCI, M.; IERARDO, G.; PROTANO, C.; VITALI, M.; POLIMENI, A. How to manage the biological risk in a dental clinic: current and future perspectives. **Minerva Stomatologica**, v, 66, n. 5, p. 232-239, 2017.

SEHULSTER, L; CHINN, R. Y; CDC; HICPAC. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v, 52, n. RR-10, p. 1-42, jun. 2003.

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.

Shim, S. H.; Han, D, H. Exposure to occupational noise and periodontitis in Korean workers. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. 4, p. 431-439, 2018.

SHIRKHANLOO, H.; FALLAH MEHRJERDI, M. A.; HASSANI, H. Identifying occupational and nonoccupational exposure to mercury in dental personnel. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 72, n. 2, p. 63-69, 2017.

SPINKS, A. T.; DUNSTAN, R. H.; HARRISON, T.; COOMBES, P.; KUCZERA, G. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1326-32, 2006.

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.

VAN DER KOOIJ, D.; BROUWER-HANZENS, A. J.; VEENENDAAL, H. R.; WULLINGS, B. A. Multiplication of Legionella pneumophila Sequence Types 1, 47, and 62 in Buffered Yeast Extract Broth and Biofilms Exposed to Flowing Tap Water at Temperatures of 38° C to 42° C. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6691-6700, 2016.

VOLGENANT, C. M. C.; PERSOON, I. F. Microbial water quality management of dental unit water lines at a dental school. **Journal of Hospital Infection**, v. 701, n. 18, p. 30588-7, 2018.

WINTHROP, K. L.; HOMESTEAD, N. High level disinfection of a home care device; to boil or not to boil? **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 3, p. 262-4, 2012.

WIRTHLIN, M. R.; MARSHALL Jr, G. W. Evaluation of ultrasonic scaling unit waterline contamination after use of chlorine dioxide mouthrinse lavage. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 3, p. 401-410, 2001.

ZHANG, Y.; PING, Y.; ZHOU, R.; WANG, J.; ZHANG, G. High throughput sequencing-based analysis of microbial diversity in dental unit waterlines supports the importance of providing safe water for clinical use. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 3, p. 357-363, 2018.

Apêndice A – Avaliação da carga bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* (UFC/FL) das amostras de linha d'água expostas a diferentes temperaturas e tempos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.

Amostras	**Temperatura ambiente**		**60°C**	
	30s	**60s**	**30s**	**60s**
1	104.000	26.000	46.800	2.600
2	520.000	92.000	2.060	2.360.000
3	72.000	12.000	480	82.000.000
4	2.800.000	180.000	1.420	7.000
5	212.000.000	340.000	0	3.860
6	110.000	3.800.000	100	320
7	1.020.000	400.000	620	20
8	1.080.000	1.880.000	2.000	460
9	100.000	166.000	496.000.000	960
10	146.000	12.600	9.600	4.160
11	3.840.000	1.420.000	4.520	0
12	150.000	10.000	40.800	0
Mediana	**335.000**	**173.000**	**2.030**	**1.780**

Legenda: UFC/FL, unidades formadoras de colônias por fragmento de linha d'água de equipo odontológico.

Apêndice B – Avaliação da carga bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* (logUFC/FL) das amostras de linha d'água expostas a diferentes temperaturas e tempos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2019.

Amostras	**Temperatura ambiente**		**60°C**	
	30s	**60s**	**30s**	**60s**
1	5,0	4,4	4,7	3,4
2	5,7	5,0	3,3	6,4
3	4,9	4,1	2,7	7,9
4	6,4	5,3	3,2	3,8
5	8,3	5,5	-	3,6
6	5,0	6,6	2,0	2,5
7	6,0	5,6	2,8	1,3
8	6,0	6,3	3,3	2,7
9	5,0	5,2	8,7	3,0
10	5,2	4,1	4,0	3,6
11	6,6	6,2	3,7	-
12	5,2	4,0	4,6	-
Mediana	**5,0**	**4,5**	**4,0**	**3,0**

Legenda: logUFC/FL, logaritmo das unidades formadoras de colônias por fragmento de linha d'água de equipo odontológico; -, sem resultado.