

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUCAS JUSTINIANO BERMEJO

**Ação do ultrassom na remoção do biofilme dos reservatórios de água dos
equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru**

BAURU
2012

LUCAS JUSTINIANO BERMEJO

**Ação do ultrassom na remoção do biofilme dos reservatórios de água dos
equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

Área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres

Versão Corrigida

BAURU
2012

B456e Bermejo, Lucas Justiniano
Ação do ultrassom na remoção do biofilme dos reservatórios de água dos equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru / Lucas Justiniano Bermejo.
Bauru, 2012.
82 p. : il. ; 31cm.

Dissertação – Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A meus pais,

Izaias Anselmo Bermejo e Aparecida de Lourdes Justiniano Bermejo,
Que sempre deram apoio e acreditaram em mim, meus tutores e razão da minha vida, meu eterno amor e carinho.

A minha irmã,

Vanessa Justiniano Bermejo,
Que tem me ajudado sempre e esteve ao meu lado quando precisei.

A meus avós,

Mário Cosme Justiniano e Iride Radigheri Justiniano,
Aparecido Anselmo de Oliveira (*in memoriam*) e Virtudes Anselmo de Oliveira Bermejo,
Pessoas maravilhosas que me guiam e apoiam sempre.

A minha namorada,

Luiza Reis Simionato,
Fonte da minha inspiração.

A meus amigos,

Carlos Eduardo Carilho, Yves Henrique de Carvalho Gonçalves, Reginaldo Martins, Astor Reis Simionato, Abrom Reis Simionato,
Companheiros indispensáveis em minha vida.

A minha família Micro,

Sérgio Aparecido Torres, Ana Paula Campanelli, André Luis da Silva, Dalva Ribeiro de Oliveira, Lívia Maria de Melo, Thais Helena Gasparoto, Carine Ervolino de Oliveira, Claudia Ramos Pinheiro, Hayana Ramos Lima, Edilene Zapater Leite, Juliana Pires, Luisa Thomazini de Freitas, Raissa Pereira Fonseca, Anelli Abe, Thalita Marcato Dalboni e Gabriela Silva Neuber de Oliveira,

Meu agradecimento por toda colaboração, paciência e conhecimento que me prestaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres,

Amigo, companheiro e tutor, sempre disposto a me ajudar num mundo até então desconhecido que optei por fazer parte da minha vida, minha eterna gratidão.

- À Faculdade de Odontologia de Bauru, sob o comando do diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira e vice-diretora Prof. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.
 - À Coordenação da pós-graduação e aos membros do Departamento de Ciências Biológicas.
 - À Comissão de apoio a pesquisa do estado de São Paulo (CAPES) que me proporcionou a bolsa de mestrado.
 - Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas que me passaram um pouco de seu conhecimento.
 - À Prof. Dra. Ana Paula Campanelli, que me deu suporte para concluir o curso.
 - Ao Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, professor e amigo, que me proporcionou estar aqui hoje, oferecendo suporte e me dando força sempre que precisei.
 - Ao professor Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, chefe de departamento e responsável pela Clínica de Dentística/Endodontia e aos demais funcionários que colaboraram para a realização deste trabalho.
 - Ao funcionário André Luis da Silva, que gentilmente me acolheu e me auxiliou e que hoje é meu grande amigo.
 - Aos funcionários Dalva Ribeiro de Oliveira e Lívia Maria de Melo, que sempre me ajudaram no que foi preciso sem medir esforços.
 - À Pós-doutoranda Thais Helena Gasparoto, minha gratidão pela paciência e sabedoria compartilhada.
-
-

-
-
- À Doutoranda Carine Ervolino de Oliveira, minha amiga, companheira de laboratório que sempre me deu força para seguir em frente e não desanimar.
 - À Doutoranda Cláudia Ramos Pinheiro, amiga e companheira que além da experiência passada, irradiava alegria e nos deixava sempre com ânimo para continuar.
 - À Doutoranda Hayana Ramos Lima, amiga e companheira que me ajudou muito nesses últimos anos.
 - À aluna de Iniciação científica, Juliana Pires, minha amiga e parceira de laboratório minha eterna gratidão por conquistar junto com você um pouquinho dessa sabedoria.
 - Aos demais membros do grupo de pesquisa do Departamento de Microbiologia e Imunologia que me propiciaram estar aqui.
 - Ao professor Dr. Ivaldo Gomes de Moraes chefe de departamento e responsável pela Clínica Dentística/Endodontia e aos demais funcionários, por permitir a coleta de água na Clínica 4, para realizar esse estudo.
 - À Valéria Cristina Trindade Ferraz, José Roberto Plácido Amadei e Ademir Padilha, pela revisão das referências bibliográficas e auxílio em obter artigos e teses para esse trabalho.
 - Ao amigo Eduardo Belai, sempre comigo desde a graduação me dando força e apoiando nos momentos difíceis.
 - À pesquisadora Ana Carolina Villas Boas Weckwerth e membros do Departamento de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima, que ajudaram a identificar os fungos de minhas amostras, minha gratidão por todo o conhecimento oferecido.
 - Aos amigos do curso de mestrado da Faculdade de Odontologia de Bauru.
-
-

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

***R**esumo*

RESUMO

Foram avaliados 25 reservatórios de água dos equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP com relação à presença de micro-organismos e a ação do ultrassom (US) na remoção do biofilme. Amostras de 10ml de água foram obtidas e alíquotas de 25µl *in natura* e diluída até 10^{-4} foram semeadas pela técnica da gota nos meios: R2A Agar (R2A), Plate Count Agar (PCA), Peptona Diluída (PD) e Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol a 1% (SDA), incubadas a 24° C por 72 horas. A água dos reservatórios foi descartada e 500 ml de água destilada esterilizada foi adicionada, sendo submetidos à ação do ultrassom (US) por 15 minutos, seguidos do mesmo procedimento descrito anteriormente. As colônias de bactérias foram quantificadas e os fungos foram identificados por micro-cultivo. A média da detecção de UFC/ml antes e após o US foi de 173.787 e 15.841 para o R2A, 104.873 e 3.034 para o PCA e de 245.824 e 8.231 para o PD. A média de fungos foi de 52,4 antes e 19,2 UFC/ml após ação do US. Fungos foram detectados em 20 reservatórios antes e em 12 deles após uso do US. O *Penicillium sp* apresentou prevalência de 36% nos reservatórios de água avaliados. Os resultados obtidos permitem concluir que o US foi eficiente em desestruturar o biofilme, embora não o elimine por completo, apresentando maior efetividade na desestruturação de bactérias.

Palavras-chave: Micro-organismo. R2A Agar. Plate Count Agar. Peptona Diluída. Ultrassom.

***A**bstract*

ABSTRACT

Action of ultrasound on biofilm removal of the dental units reservoir of water from Bauru School of Dentistry

A total of 25 waterline unit reservoirs of the odontological sets from the Dentistry/Endodontic Clinic of FOB/USP were assessed, in relation to the presence of microorganisms and the ultrasound action (US) on the biofilm removal. Waterline samples of 10ml were obtained from aliquots of 25µl in natura and diluted until 10^{-4} , then, they were spread using the dripping technique on the means: R2A Agar (R2A), Plate Count Agar (PCA), diluted Peptone (DP) and Sabouraud Dextrose Agar with cloranfenicol at 1% (SDA), being incubated at 24° C for 72 hours. The waterline units of the reservoirs were discarded and 500 ml of sterilized distilled water was added, submitted to ultrasound action (US) for 15 minutes, following the same procedure described afore. The bacteria colonies were quantified and the fungi were identified through micro-culture. The average of detection of UFC/ml before and after US was 173.787 and 15.841 for R2A, 104.873 and 3.034 for PCA and of 245.824 and 8.231 for PD. The fungi average was 52,4 before and 19,2 UFC/ml after the action of US. Fungi were detected in 20 reservoirs before and 12 after using US. *Penicillium* sp showed a prevalence of 36% in the waterline reservoirs assessed. The results obtained, led to the conclusion that US was efficient to break the structure of the biofilm, although it did not eliminate it completely, showing more effectiveness to break the bacteria structure.

Key-words: Microorganism. R2A Agar. Plate Count Agar. Diluted Peptone. Ultrasound

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1.** Presença de UFC/ml detectadas nos meios R2A, PCA e PD, antes e após o US..... 45
- Figura 2.** Fotos de macro e microcultivos de fungos encontrados na Clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP..... 47-49

- GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Valores médios de UFC/ml nos 25 reservatórios de água, em diferentes meios de cultura após a aplicação do US..... 42
- Gráfico 2.** Detecção de UFC/ml, nos diferentes meios de cultura, após várias aplicações do US, no reservatório 1 da Clínica de Dentística/Endodontia da FOB-USP 43
- Gráfico 3.** Análise da qualidade da água armazenada para uso nos reservatórios da clínica de Dentística/Endodontia da FOB-USP..... 44
- Apêndice C.** Comparação entre o meio R2A e R2A com US..... 76
- Apêndice D** Comparação entre o meio PCA e PCA com US 77
- Apêndice E** Comparação entre o meio PD e PD com US 77
- Apêndice F.** Comparação entre os meios R2A, PCA e PD sem a ação do US..... 78
- Apêndice G.** Comparação entre os meios R2A, PCA e PD com a ação do US..... 78
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Médias da detecção de micro-organismos totais nos meios R2A, PCA, PD e SDA, antes e após a ação do ultrassom, em 25 reservatórios de água..... 41
- Tabela 2.** Contagem de UFC/ml, após sucessivas aplicações do US, no reservatório (R1)..... 42
- Tabela 3.** Análise da qualidade da água armazenada para uso na Clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP..... 43
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA American Dental Association

PCA Plate Count Agar

PD Peptona Diluída

R2A R2A Agar

UFC/ml Unidade formadora de colônia por mililitro

US Ultrassom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
3	PROPOSIÇÃO.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
5	RESULTADOS	39
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICE	73
	ANEXOS	79

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Blake (1963) os reservatórios de água dos equipos odontológicos que abastecem a seringa tríplice e a caneta de alta rotação apresentavam níveis significativos de micro-organismos. O período em que estas unidades se encontram sem uso favorece a proliferação destes micro-organismos que formam o biofilme e são disseminados à caneta e à seringa do equipo.

Pouca atenção tem sido dada à qualidade da água em consultórios odontológicos frente à contaminação por micro-organismos (TIPPETT; EDWARDS e HOWARD, 1988; MAYO; OERTLING e ANDRIEU, 1990; WILLIANS, 1995). Pankhurst e Philpott-Howard (1993) citam que o aumento da população microbiana favorece o desenvolvimento de micro-organismos oportunistas e podem ocasionar maiores danos à saúde de indivíduos idosos, diabéticos, transplantados, pós-cirúrgicos, aidéticos, submetidos a intervenções químicas (quimioterapia) ou físicas (radioterapia) e em portadores de fibrose cística.

Na odontologia, a análise da contaminação da água utilizada em seus procedimentos normais se mostra extremamente necessário, uma vez que vai diretamente à cavidade bucal do paciente. No entanto, a própria água que chega do abastecimento público já vem com uma contaminação mínima permitida pelos órgãos responsáveis. A American Dental Association (ADA, 1996) permite uma quantidade mínima de 200 UFC/ml de água; no Japão essa quantidade é de 100 UFC/ml (PREVOST et al., 1995) e, aqui no Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o limite de 500 UFC/ml (BRASIL, 2011).

Em um consultório odontológico o risco de infecção cruzada é eminente, seja paciente-profissional ou profissional-paciente com micro-organismos transmitidos pelos aerossóis, sangue, ar e até mesmo com instrumentos e materiais usados diretos em lesões. A caneta de alta rotação e a seringa tríplice são aparatos que utilizam água proveniente dos reservatórios e que passam pelos ductos do equipo. Ocorre, no entanto, que algum refluxo de material da boca do paciente para os ductos que têm contato direto com os reservatórios, e estes por sua vez, podem acabar sendo contaminados. A microbiota bucal tem uma rica diversidade bacteriana que pode ser dispersa por aerossóis decorrentes de tratamento odontológico, podendo comprometer a saúde tanto do paciente quanto do profissional (GREINER, 1995; O' DONNELL et al., 2005).

O reservatório é uma fonte de grande contaminação de micro-organismos, sendo este um local disseminador de possíveis patógenos à cavidade bucal do paciente. Segundo Watanabe (2003) os ductos dos equipos são possíveis fontes de contaminação em virtude da formação do biofilme e, neste estudo, comprovou que a limpeza é indiscutivelmente importante para a remoção do mesmo. A água que fica alojada neste local permite que estes organismos se aglomerem, formando estruturas conjuntas denominadas biofilme, enquanto outros ficam dispersos neste líquido (forma planctônica). Dolci e Montebugnoli (2000) relatam formação de biofilme na parede das linhas de água dos equipos odontológicos podendo este ser proveniente do próprio abastecimento público. Ambas as formas oferecem riscos ao paciente, uma vez que em procedimentos mais invasivos, como em uma cirurgia ou no tratamento endodôntico, estes micro-organismos podem ser levados a áreas internas e ou profundas, podendo promover uma infecção sistêmica nos pacientes. Em casos de pacientes imunossuprimidos a contaminação se torna ainda mais perigosa, podendo levar o indivíduo a óbito.

Micro-organismos formam um biofilme na parede do reservatório e ductos dos equipos promovendo, através da água, um meio de vida para que perpetuem suas espécies (GUIMARÃES JR, 2001). Segundo Watanabe (2003) e Agostinho (2004) a contaminação da água de equipos odontológicos é evidente. Um dos fatores que mais contribui para o aparecimento de micro-organismos é a formação de uma massa de bactérias, fungos e até algas que se originam no interior do equipamento odontológico sendo facilmente disseminado para outras partes.

O presente trabalho aborda a presença de contaminação em reservatórios da água de equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP e, avalia um método para remover e evitar a formação do biofilme, que se mostra intensamente resistente aos métodos químicos empregados na tentativa de sua remoção.

Segundo Scherba; Weigel e O'Brien Jr (1991), a cavitação, um mecanismo obtido pelo ultrassom, pode afetar um sistema biológico em virtude do aumento da temperatura em razão da aceleração das moléculas presentes na água ou em algum outro tipo de líquido que for utilizado. Os autores utilizaram cultivos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias), *Trichophyton mentagrophytes* (fungo), herpesvírus felino e calcivírus felino (vírus), para verificar a ação do ultrassom. Esses agentes foram submetidos a diferentes frequências e tempos de ação do ultrassom que induziu a

diminuição destes agentes de acordo com a intensidade das ondas do ultrassom: quanto maior a intensidade e o tempo, maiores foram às ações sobre estes agentes.

Há grande interesse em avaliar a ação do ultrassom, como uma alternativa complementar, para a limpeza e remoção do biofilme presente nos reservatório de água dos equipos odontológicos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Blake (1963) analisou a qualidade da água em reservatórios, seringas tríplices e de alta rotação em um consultório odontológico de um hospital. Utilizando 0,1ml das amostras *in natura* e diluída, semeadas em placas de agar sangue, incubadas a 37° C por 24 horas. Como resultado obteve contaminação em todas as amostras, o que indicou contaminação dos reservatórios.

Mills, Lauderdale e Mayhew (1986) avaliaram a contaminação microbiana de 10 equipos odontológicos com reservatórios preenchidos com água esterilizada. Foram semeadas amostras, *in natura* e diluídas, em placas contendo o Agar Dextrose, mantidas a temperatura ambiente por 48, 96 e 120 horas. Verificaram contaminação que excedeu a 7×10^3 UFC/ml.

Whitehouse et al. (1991) avaliaram a contaminação da água e formação de biofilme em ductos de equipos odontológicos. Amostras *in natura* e diluídas foram semeadas em placas com meio Tryptose Blood Agar com extrato de levedura e incubadas a 37° C por 48 horas. Utilizaram a drenagem por 20 minutos e depois permitiram a reconstituição do biofilme por 48 horas. Após esse período, os equipos foram operados normalmente e amostras de água foram coletadas em pequenos intervalos de tempos. Também, pequenos fragmentos dos ductos foram submetidos à análise em microscopia óptica e eletrônica, o que comprovou a presença de massa microbiana. Antes de submeter, as tubulações de água, à ação de drenagem, todas as amostras estavam contaminadas e excediam os valores permitidos, no entanto após 5 e 20 minutos a contaminação regrediu quando não foi eliminada.

A contagem de bactérias heterotróficas é recomendada pelo Ministério da Saúde para verificar a qualidade da água nos sistemas de abastecimentos públicos e preconiza que não deve exceder as 500 UFC/ml (FANTINATO et al., 1992).

Os ductos de abastecimento do equipo odontológico apresentam grande extensão, e as superfícies internas são irregulares, o que facilita a adesão de micro-organismos que recobrem essa área e formam o biofilme, composto por uma película rica em polissacarídeos e glicoproteínas (PREVOST et al., 1995).

Shearer (1996) cita que os ductos dos reservatórios dos equipos odontológicos são um ambiente favorável ao desenvolvimento do biofilme devido a sua extensão e ao fluxo de água.

A água da seringa tríplice e da caneta de alta rotação, apresentou maior número de micro-organismos, do que os reservatórios, pois a estrutura do biofilme é capaz de reter, proteger e até nutrir os micro-organismos, no entanto, não serviu como meio de proliferação para os vírus.

Segundo a ADA (1996) esse valor não deve ultrapassar as 200 UFC/ml em reservatórios ou nos ductos dos consultórios odontológicos (CARDOSO et al., 1999). Segundo Wingender; Neu e Curt (1999), biofilmes são agregados de vários micro-organismos, envolvidos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que constituem o seu habitat e que os alimentam e os protegem.

Aguiar e Pinheiro (1999) avaliaram a contaminação da água de reservatórios odontológicos e constataram que a qualidade da água não era condizente com o proposto pelos órgãos responsáveis no Brasil, podendo haver até risco de infecção cruzada. Não foi observado efeito bactericida do sistema Flush, o que sugere que a concentração usada não foi suficiente para eliminar os micro-organismos.

Ito et al. (1999) analisaram a contaminação da água dos equipos odontológicos utilizando placas PetrifilmTM AC (3M, St Paul, MN, USA). Foram avaliadas duas situações, antes e após a drenagem do sistema. As amostras foram incubadas em câmara úmida a 35° C por 48 horas. Constataram uma contaminação muito elevada, antes e depois e, que o cultivo em PetrifilmTM foi de fácil utilização, sendo rápido para a quantificação dos micro-organismos na Odontologia.

Arvanitidou et al. (1999) avaliaram a contaminação por fungos em água potável. Foram coletadas 126 amostras, sendo 84 provenientes de hospitais e 42 de origem comunitária e sempre após 3 a 5 minutos de drenagem de água das torneiras. O meio Sabourad Dextrose Agar acrescido de cloranfenicol foi mantido em temperatura ambiente por 3 a 4 semanas enquanto as bactérias heterotróficas eram cultivadas em meio Plate Count Agar pela técnica *pour plate* e incubadas a 37° C por 48 horas. Foram obtidos exemplares de fungos filamentosos e leveduriformes. O número de bactérias não excedeu o preconizado pela ADA, quando a coleta foi feita diretamente de torneiras que recebiam o tratamento a base de cloro.

Kim; Cederberg e Puttaiah (2000) avaliaram duas concentrações diferentes de hipoclorito de sódio para reduzir o biofilme nas linhas de água dos equipos odontológicos. Os reservatórios foram submetidos à desinfecção com 1500ppm e 5.000ppm de hipoclorito de

sódio, abastecidos com água de torneira e água pasteurizada. Amostras das águas foram passadas pelo filtro Millipore e cultivadas em Heterotrophic Plate Counting (HPC), incubadas a 24°C por 7 dias, quando foram quantificadas as bactérias heterotróficas. Não houve diferença estatisticamente significante entre as duas concentrações de hipoclorito de sódio, entretanto, os autores constataram que as contagens obtidas a partir da água pasteurizada foram inferiores às da torneira.

Os estudos de Roberts, Karpay e Mills (2000) e Taylor-Hardy et al. (2001) relatam que compostos como hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina podem afetar a força de adesão das resinas aos tecidos como esmalte e dentina.

Putnins, Di Giovanni e Bhullar (2001) constataram a contaminação microbiana das linhas de água de equipos odontológicos e observaram a presença de endotoxinas (LPS). Foram coletadas amostras de 11 equipos. Estas foram utilizadas *in natura* e diluídas, semeadas em meio R2A agar e incubadas à temperatura de 35° C por 7 dias. Segmentos dessas linhas de água foram cortados e analisados com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura. A análise de endotoxinas foi realizada com o teste de Limulus Amebocyte Lysate – (LAL – Sigma). Os equipos apresentaram formação de biofilme contendo bactérias com prevalência de bacilos gram negativos e fungos filamentosos. Os níveis microbianos obtidos foram significativamente elevados ($1,3 \times 10^4$ UFC/ml). Concluíram que os níveis de bactérias, fungos e LPS encontrados ofereciam risco aos pacientes.

De acordo com Araujo e Lopes-Silva (2002) a água dos reservatórios avaliados não demonstrou qualidade e a contaminação microbiana, excedia os valores normais permitidos pelo Ministério da Saúde, podendo ser uma fonte de infecção cruzada. O trabalho analisou diversas amostras de água do consultório de Odontopediatria, onde foi detectado contaminação superior a 5.000 UFC/ml. Um em que foi usado água mineral, apresentou 741 UFC/ml. No entanto, em outro que foi usado a água de abastecimento público, constataram apenas 3 UFC/ml. Os autores concluíram que metade das amostras não apresentou níveis de potabilidade e que o risco de infecção cruzada era grande, além da necessidade de ter cuidados, ao manusear a água a ser empregada nos equipamentos odontológicos.

Segundo Flemming (2002), bactérias heterotróficas aeróbias utilizam compostos orgânicos presentes na água de abastecimento público para suprir suas necessidades e formar uma biomassa. Chibebe, Ueno e Pallos (2002) analisaram a contaminação da água dos

equipos odontológicos de consultórios particulares e públicos da cidade de Taubaté- SP. As amostras *in natura* e diluída foram semeadas, pelo método *pour plate*, em placas de petri contendo o meio Tryptic Soy Agar (TSA – DIFCO) e incubadas a 37° C por 48 horas. Entre os equipos analisados, houve uma grande diversidade referente às marcas comerciais. A água utilizada para preencher os reservatórios era proveniente da torneira, filtro caseiro e até mesmo água mineral. Foram constatados 72,5% dos equipos odontológicos fora dos padrões exigidos pela ADA e as clínicas particulares apresentaram menor número de contaminação em comparação com as clínicas públicas.

Kettering et al. (2002), avaliaram 15 equipos odontológicos recém fabricados com reservatórios de garrafa PET. Foram coletadas amostras entre 2 a 6 semanas, sendo que a água utilizada nos reservatórios era esterilizada. As amostras eram coletadas 30 segundos após acionar a drenagem, e processadas no laboratório de microbiologia. As amostras foram homogenizadas e diluídas a 1:20 e 1:2000 em água deionizada esterilizada. Após, 100ml das suspensões foram filtradas por membrana de 47mm de diâmetro e semeadas em placas contendo o meio R2A (DIFCO), mantidas em temperatura ambiente por 5 dias. Verificaram uma variação de 4 a 95 UFC/ml em suas amostras sendo que a drenagem, utilizando água esterilizada, após 6 semanas se mostrou ineficaz contra a presença dos micro-organismos, quando foi constatada uma média de 6.447 UFC/ml.

Souza-Gugelmin et al. (2003) constataram a contaminação microbiana em equipos odontológicos na cidade de Ribeirão Preto – SP. Amostras foram diluídas até 10^{-6} e semeadas em meio Plate Count Agar empregando a técnica de *pour plate*, e incubadas a 32°C por 48 horas. O índice de contaminação da seringa tríplice e da caneta de alta rotação foi significativamente mais elevado que o dos reservatórios de água. Constataram que a formação do biofilme foi o fator de contaminação das linhas de água.

A remoção do biofilme por métodos químicos tem alguns aspectos que dificulta sua aplicação na Odontologia, pois, pode interferir nos tecidos bucais e dentes. Agostinho (2004) avaliou três substâncias químicas: o detergente de mamona, Amonex T.A e Ster4pray, na tentativa de remover o biofilme das linhas de água e concluiu que a ação química destes componentes foi temporariamente eficiente, voltando o biofilme a se formar logo após alguns dias.

Montebugnoli et al. (2004) analisaram a contaminação de ductos de equipos odontológicos pela presença de bactérias periodontais patogênicas, através da reação de polimerase em cadeia (PCR). O estudo foi realizado em 18 equipos de marcas distintas, separados em dois grupos de 9 equipos: grupo controle, os que não foram utilizados e o grupo usado no atendimento de rotina. Pequenos segmentos das linhas de água foram removidos e avaliados em relação à presença de DNA de micro-organismos específicos. O estudo demonstrou que a detecção do DNA foi verificada apenas no grupo usado frequentemente nos atendimentos, indicando claramente uma possível fonte de transmissão de doenças periodontais.

Palenik; Burgess e Miller (2005) avaliaram o tempo de processamento como determinante no resultado de uma análise microbiológica. O estudo foi realizado com água proveniente dos reservatórios de equipos odontológicos e das canetas de alta rotação. Amostras *in natura* e diluídas foram semeadas pela técnica “*spiral plater*” em placas contendo o meio R2A, incubadas à 21°C por 7 dias. O primeiro processamento se deu logo após a coleta e os resultados indicaram um nível elevado de contaminação (1.540 a 866.000 UFC/ml), porém, quando incubados a 37°C o nível de crescimento foi menor em relação à incubação a 21°C. No segundo processamento, após 5 dias da coleta, 70% das amostras apresentaram níveis muito elevados. Em outro experimento, quando uma amostra foi analisada após algum tempo da coleta, verificaram níveis elevados (500UFC/ml) e quando mantida em temperatura ambiente constataram um crescimento maior do que a primeira (780 a 376.000 UFC/ml). E uma terceira amostra, conduzida em ambiente refrigerado obteve os mesmos resultados da primeira amostra, o que demonstrou que a temperatura e o tempo de processamento influenciam no crescimento dos micro-organismos e que a análise imediata da amostra pode evitar esse problema.

Watanabe et al. (2005) analisaram a contaminação da água dos equipos odontológicos por fungos filamentosos e leveduriformes, pelo uso do sistema Petrifilm YM para leveduras e bolores. As amostras foram obtidas de 24 equipos da clínica da Associação Odontológica de Ribeirão Preto – SP, sendo separados em dois grupos: um grupo de equipos antigos e outro de novos. Amostras de água provenientes da seringa tríplice, da caneta de alta rotação, do reservatório do equipo e da torneira foram analisadas. Mais de 90% das amostras dos equipos velhos apresentaram fungos; no entanto, o grupo de equipos novos e da torneira de água não demonstraram contaminação por fungos. Concluíram que a água do equipo pode veicular fungos nas clínicas odontológicas e que estas podem oferecer riscos aos pacientes.

Szymanska (2006) analisou a contaminação microbiana da água em equipamentos odontológicos e a ação microbicida de um desinfetante, o Oxygenal 6. Foram analisados 25 equipamentos e segmentos das linhas de água foram extraídos para análise de contaminantes. O material foi semeado em placas contendo o meio EMB e agar sangue. A identificação dos micro-organismos foi feita por meio dos testes API 20E, API 20 NE (bioMérieux, France) e GP2 MicroPlate™ (BIOLOG, USA), sendo encontrada antes do uso do desinfetante, a prevalência de bactérias gram-negativas (principalmente *Ralstonia pickettii*) e de alguns cocos gram-positivos. Porém após a ação do desinfetante, outro bacilo gram-negativo, o *Sphingomonas paucimobilis* foi o que predominou. Entretanto, 13 equipamentos apresentaram ausência de contaminação, sugerindo uma efetiva ação do desinfetante Oxygenal 6.

Watanabe et al. (2006b) analisaram a contaminação da água proveniente da caneta de alta rotação e da seringa triplice, pela contagem de colônias (UFC/ml) no meio Plate Count Agar (PCA) e no Petrifilm, ambos incubados a 35°C por 48 horas. Os resultados mostraram a elevada contaminação da água e a necessidade em remover o biofilme das paredes destes ductos.

Watanabe; Pimenta e Ito (2007) compararam o sistema Petrifilm™ AC (3M, St Paul, MN, USA) e o Simplate WHPC (IDEXX, Westbrook, MN, USA) para a detecção de contaminação nos equipamentos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Foram usados 10 equipamentos, dos quais foram coletados cerca de 10ml de água das seringas triplices, que foram semeados pela técnica do teste rápido. Metade, cerca de 5 equipamentos, apresentaram níveis de contaminação em um padrão aceitável pela ADA (1996) com valores inferiores a 200 UFC/ml e 8 equipamentos dentro dos valores da legislação brasileira, onde se permite a presença de até 500 UFC/ml. Os autores concluíram que estatisticamente não houve diferença entre os dois métodos usados, mas que o sistema Petrifilm™ foi mais prático e adequado para esse tipo de avaliação.

Algumas bactérias têm a capacidade de se comunicar através de um mecanismo denominado Quorum Sensing (QS), que são sinalizadores químicos secretados pelas próprias células. Jensen et al. (2007) observaram que em colônias de *Pseudomonas aeruginosa*, essa comunicação ocorre, associada à formação de biofilme e a fator de virulência. Lenz et al. (2008), citaram que as diferenças fenotípicas existentes em biofilmes são comuns, há uma

diversidade na expressão de moléculas de superfície que podem proteger e resistir à ação de diversos antibióticos.

Os biofilmes são agregados de vários micro-organismos, imersos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que constituem o seu meio, os alimentam, estruturam e os protegem (KARATAN; WATNIK, 2009). De acordo com Flemming e Wingender (2010), a morfologia do biofilme, embora mista, pode ser plana, áspera, macia ou filamentosa e a matriz imobiliza temporariamente suas células para permitir sua existência por longo prazo. A estrutura do biofilme é mediada por diversos fatores sendo o fator nutricional, a mobilidade das células e a comunicação entre esses indivíduos, os principais fatores responsáveis pela permanência, organização e arquitetura do biofilme.

Sherba; Weigel e O'Brien Jr (1991) demonstraram a eficácia do US devido às suas propriedades hidrodinâmicas que causam ondas de choque e que desestabilizam e desestruturam o biofilme, assim como os micro-organismos, em geral, sob uma frequência de 26 kHz, obtendo uma diminuição destes agentes de acordo com a intensidade das ondas do ultrassom: quanto maior a intensidade e maior tempo, maior era a quebra do biofilme.

Phull et al. (1997) relataram que a destruição ou inativação de micro-organismos pela aplicação de ondas ultrassônicas foi avaliada e comprovada, sendo um meio viável de desinfecção de água para abastecimento. Os autores afirmam que a associação do US com o cloro permitiu uma queda acentuada no número de UFC/ml de micro-organismos presentes na água e que as ondas de maior intensidade (alta frequência) são mais eficientes do que as de baixa intensidade no processo de desinfecção de águas.

Segundo Domingos (1998), o US apresenta o efeito de cavitação que é a formação de cavidades ou bolhas no meio líquido, gerando certa quantidade de gás, que pode acarretar mudança estrutural ou funcional da célula. Outra situação é a de romper as ligações moleculares ocasionando a produção de radicais livres (H⁺ e OH⁻) e, como consequência, causam modificações químicas.

O presente trabalho visou avaliar a presença de micro-organismos nos reservatórios de água dos equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP e testar a ação do ultrassom (US) como um método para remover ou reduzir a formação do biofilme, que demonstrou ser resistente aos métodos químicos empregados na tentativa de sua remoção.

3 *Proposição*

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a contaminação nos reservatórios de água do equipo odontológico da Clínica Dentística/Endodontia da FOB- USP.
 - Avaliar a eficácia do ultrassom em remover o biofilme do reservatório de água do equipo odontológico.
 - Verificar os tipos morfológicos de bactérias e fungos presentes no biofilme.
 - Avaliar a detecção de bactérias nos meios R2A, PCA e PD.
 - Identificar os fungos encontrados através do macro e micro-cultivo.
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletadas alíquotas de 10ml de água de 25 reservatórios dos equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Os reservatórios são de polietileno e com capacidade de aproximadamente 500 ml. O período entre as coletas e o início do processamento não excedeu 30 minutos.

Contagem das bactérias heterotróficas e fungos

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, BR) onde as amostras de água foram homogeneizadas em agitador por 1 minuto em potência máxima, e em seguida, alíquotas de 1,0ml foram transferidas para um tubo contendo 9,0ml de solução salina (diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). Alíquotas de 25 μ l das amostras e das diluições foram semeadas, pela técnica da gota, em placas de 60x13mm, contendo 5,0 ml dos meios de cultura: *Plate Count Agar* – PCA (Difco™, USA), *R2A Agar* (Difco™, USA), Peptona Diluída – PD (Maki et al., 1986) e *Sabouraud-Dextrose Agar* – SDA (Difco™, USA).

A seguir, a água dos reservatórios foi descartada e, os mesmos, foram preenchidos com 500 ml de água destilada esterilizada e submetidos à ação do ultrassom (UNIQUE, Santo Amaro-SP, BR) por 15 minutos. O mesmo procedimento microbiológico descrito acima foi repetido e as placas incubadas a 24°C por até 72 horas. A contagem das bactérias foi expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). O nível de contaminação foi avaliado conforme a portaria nº 518 do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2011).

O *R2A Agar* (Difco™, USA) é utilizado para análise de bactérias heterotróficas em água, conforme o proposto por Reasoner e Geldreich (1985). A cada 18,2 gramas do meio de cultura, foi adicionado 1000 ml de água destilada, de acordo com as instruções do fabricante. Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, alíquotas de 5,0ml foram distribuídas em placas de petri (60x13mm) previamente esterilizadas.

Ágar R2A

Extrato de levedura.....	0,50g
Peptona protease n.º 3.....	0,50g
Ácidos casamino.....	0,50g
Dextrose.....	0,50g
Amido solúvel.....	0,50g
Piruvato de sódio.....	0,30g
Difosfato de potássio.....	0,30g
Sulfato de magnésio.....	0,05g
Ágar.....	15,00g
Água destilada.....	1000ml

O *Plate Count Agar* (Difco™, USA) é utilizado para a contagem total de bactérias de alimentos e água. Para cada 23,5 gramas do meio, foi adicionado 1000 ml de água destilada. Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, alíquotas de 5,0ml foram distribuídas em placas de petri (60x13mm) previamente esterilizadas.

Plate Count Agar - PCA

Digesto Pancreatico de Caseína.....	5,00g
Extrato de Levedura.....	2,50g
Dextrose.....	1,00g
Ágar.....	15,00g
Água destilada.....	1000ml

O Ágar Peptona Diluído é um meio de cultura recomendado para a contagem de micro-organismos existentes na água, sendo formulado segundo as especificações propostas por Maki et al., (1986). Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, alíquotas de 5,0ml foram distribuídas em placas de petri (60x13mm) previamente esterilizadas.

Ágar Peptona Diluída - PD

Peptona.....	0,01g/%
Mg SO4 7H2O.....	0,06/%
Fe CL3.....	0,002/%
Agar.....	2g
Água destilada.....	1000ml

O Ágar Sabouraud-dextrose – SDA (Difco™, USA) é específico para o isolamento e confirmação de fungos saprófitos e patogênicos. Para cada 65 gramas do meio de cultura, foi

adicionado 1000 ml de água destilada. Após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos, acrescentar cloranfenicol, para a concentração final de 1%, para inibir o crescimento bacteriano. O meio foi distribuído em alíquotas de 5,0ml em placas de petri (60x13mm, previamente esterilizadas) e, em tubos (18x180mm, esterilizados), contendo 10,0ml do SDA com cloranfenicol a 1%, mantidos em posição inclinada, para estoque das amostras.

Ágar Sabouraud-dextrose - SDA

Digesto Enzimático de Caseína	10,00g
Dextrose	40,00g
Ágar	15,00g
Água destilada	1000 ml

Identificação de fungos

Os fungos/leveduras após serem quantificados, foram re-isolados em placas de petri (60x13mm) contendo o SDA com cloranfenicol a 1%, para confirmar a presença de cultura axênica e, a seguir, estocados na superfície inclinada em tubos (18x180mm) contendo o SDA com cloranfenicol a 1%, mantidos em temperatura ambiente, para posterior identificação.

Microcultivo

A técnica do microcultivo em lâminas para a identificação dos fungos/leveduras, consiste em evidenciar determinadas estruturas dos micro-organismos. No entanto, o SDA nem sempre fornece as condições para a expressão dos corpos de frutificação; neste caso foi utilizado o Ágar Batata com tween 80 (AB). Uma pequena porção na forma circular de aproximadamente 2 cm de diâmetro e 1cm de espessura foi depositada em cima da lâmina, que foi inoculada em quatro pontos com a amostra do fungo.

Em placas de petri (previamente esterilizadas com uma lâmina suspensa sobre um suporte de vidro em forma de “V”), foi acrescentado o bloco de agar batata, já semeado e coberto por uma lamínula. Foi acrescentado um chumaço de algodão embebido em água destilada, ambos esterilizados, para hidratar o cultivo, a seguir, placa foi tampada e vedada com fita crepe e incubada à temperatura de 24° C por 7 a 15 dias.

Ágar Batata – AB

Glicose	2g
Neopeptona (Difco)	1g
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1g
Ortofosfato de potássio diidrogenado	1g
Tween 80.....	10 ml
Ágar	20g
Água destilada	1000 ml

O microcultivo para leveduras foi feito seguindo o mesmo procedimento, tendo como diferença a lâmina coberta pelo agar Fubá (AF), semeada com a amostra no sentido horizontal por toda a extensão da lâmina sob a forma de tiras (dispostas em linhas) e coberta com a lamínula. Da mesma forma como realizado no cultivo para fungos, foi acrescentado algodão umedecido com água destilada, ambos esterilizados, a placa foi tampada e vedada, conforme descrito anteriormente, seguido de incubação à 37° C por 7 a 15 dias. Após verificar o crescimento, a leitura foi realizada pelo acréscimo do corante lactofenol azul de algodão sobre o cultivo, para a observação no microscópio dos corpos de frutificação dos fungos e estruturas das leveduras.

Ágar Fubá

Fubá	40g
Tween 80.....	10 ml
Ágar	20g

Análise estatística

O teste de Friedman ANOVA foi empregado para avaliar a eficácia dos meios de cultura R2A, PCA, PD e SDA com 1% de cloranfenicol na recuperação de colônias antes e após a ação do US. O teste de Wilcoxon foi usado para avaliar a remoção do biofilme antes e após a ação do US.

5 *Resultados*

5 RESULTADOS

5.1. Bactérias

A presença de bactérias totais foi detectada nos 25 (100%) reservatórios quando usados os meios de cultura R2A e PD, em 24 (96%) no PCA antes da ação do US. Após a aplicação do US, a presença de contaminação foi constatada nos 25 (100%) reservatórios no meio PCA, em 24 (96%) para o R2A e em 23 (92%) reservatórios, para o PD, conforme apresentado no **ANEXO A**.

A detecção de contaminação nos reservatórios de água apresentou médias maiores para o meio PD, seguido pelo R2A e por último o PCA. Após a ação do US, o meio R2A apresentou melhor recuperação de UFC/ml, seguido pelo PD e com a menor detecção no PCA, conforme apresentado na **Tabela 1 e Gráfico 1**.

Tabela 1. Médias da detecção de micro-organismos totais nos meios R2A, PCA, PD e SDA, antes e após a ação do ultrassom, em 25 reservatórios de água.

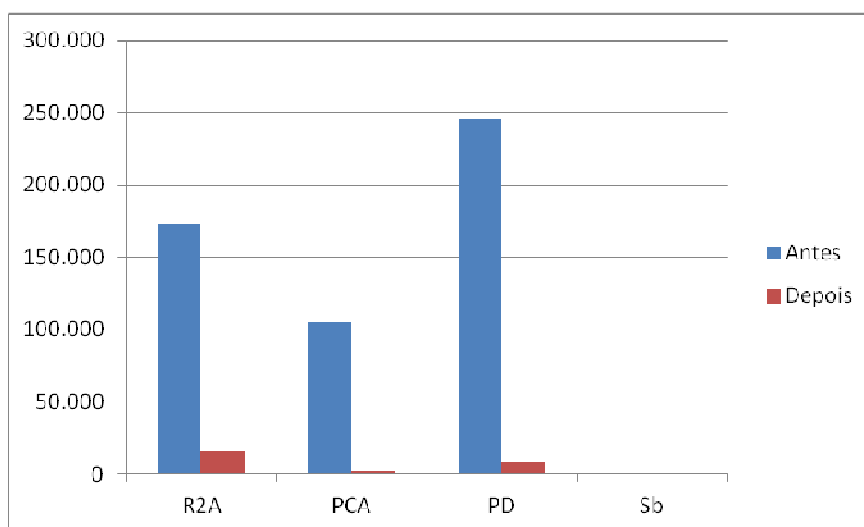
Meio de cultura	Antes*	Depois*	Desestruturação (%)	Taxa de redução
R2A	173.787	15.841	90,89%	10,97 vezes
PCA	104.873	3.034	97,11%	34,57 vezes
PD	245.824	8.231	96,65%	29,87 vezes
SDA	52,4	19,2	63,36%	2,73 vezes

Legenda: * Valores médios referentes à UFC/ml

Nenhum dos reservatórios apresentou nível de colonização inferior a 200 UFC/ml. Apenas 1 (4%) reservatório (R16), apresentou contagem inferior a 500 UFC/ml, indicando a presença de elevado número de bactérias totais, para os meios R2A, PCA e PD, antes e após a ação do US.

A ação do US foi eficaz em remover o biofilme, conforme demonstrado na **Tabela 1**, em que houve redução de UFC/ml em todos os meios de cultura, embora não o eliminou por completo. A desestruturação do biofilme foi mais evidente sobre as bactérias do que os fungos presentes nos reservatórios de água.

Grafico 1 – Valores médios de UFC/ml nos 25 reservatórios de água, em diferentes meios de cultura após a aplicação do US.



Para confirmar a ação do US, o reservatório (R1) foi submetido a cinco aplicações sucessivas. Verificamos eficácia do US em reduzir a população microbiana após a primeira e a segunda aplicação. No entanto, na terceira vez, um aumento significativo de UFC/ml foi verificado para os meios R2A e PCA, enquanto, no meio PD não foi detectado nenhum crescimento. Após a quarta aplicação, houve aumento de UFC/ml nos meios PCA e PD, entretanto, para o meio R2A houve redução. Na quinta aplicação do US, os meios R2A e PD apresentaram elevação de UFC/ml e para o PCA ocorreu redução, conforme é demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Contagem de UFC/ml, após sucessivas aplicações do US, no reservatório (R1).

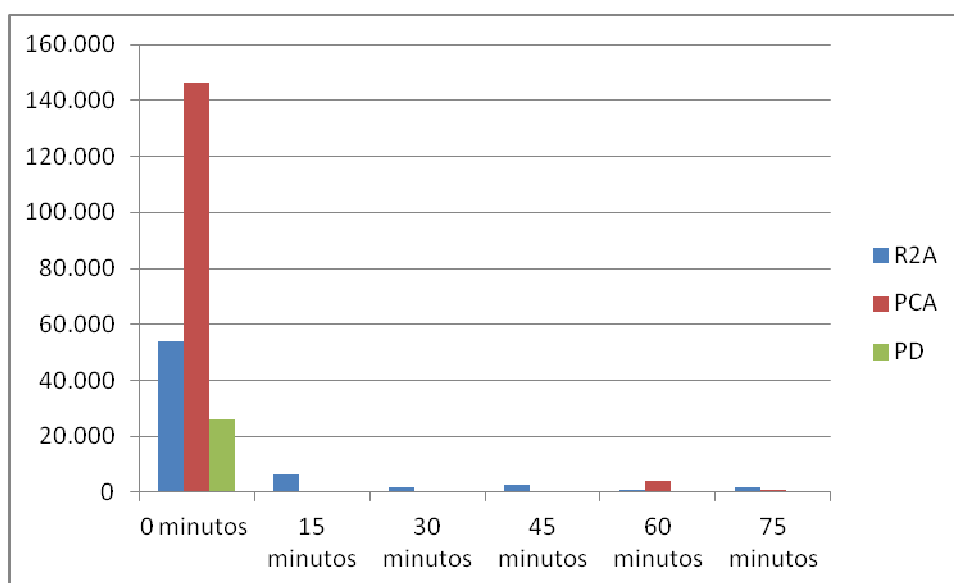
	R2A	R2A*	PCA	PCA*	PD	PD*
Sem US	54.000	-	146.300	-	26.200	-
15 minutos	6.240	↓ 8,65 vezes	560	↓ 261,25 vezes	440	↓ 59,54 vezes
30 minutos	1.787	↓ 3,49 vezes	280	↓ 2 vezes	0	↓ -
45 minutos	2.573	↑ 1,44 vezes	620	↑ 2,21 vezes	0	= -
60 minutos	1.040	↓ 2,47 vezes	3.947	↑ 6,36 vezes	120	↑ -
75 minutos	1.973	↑ 1,89 vezes	840	↓ 4,7 vezes	260	↑ 2,16 vezes

Legenda: * Valores referentes ao

↑ Aumento de UFC/ml

↓ Redução de UFC/ml

Gráfico 2 – Detecção de UFC/ml, nos diferentes meios de cultura, após várias aplicações do US, no reservatório 1 da Clínica de Dentística/Endodontia.



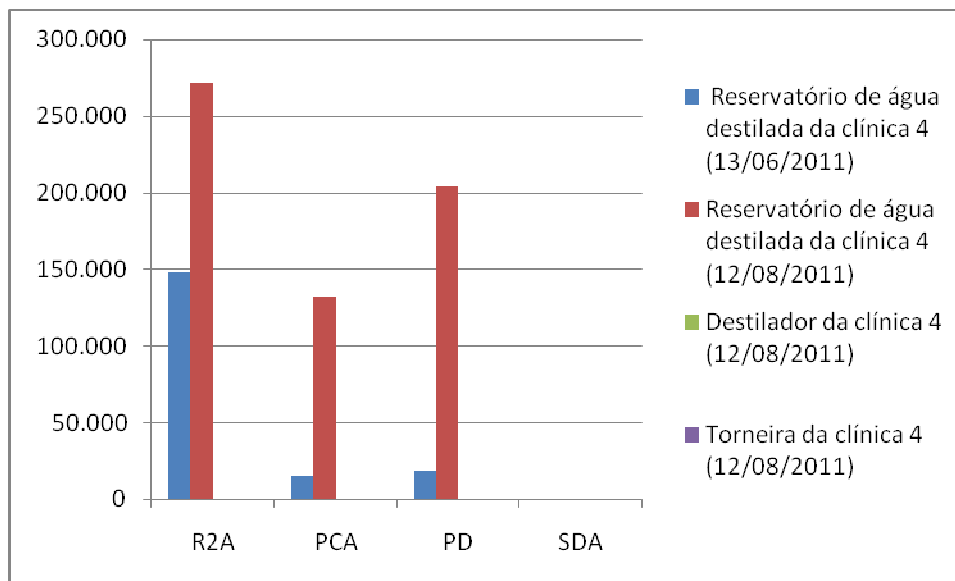
O reservatório de estoque de água destilada, no qual era armazenada a água para a Clínica de Dentística/Endodontia apresentou elevado número de micro-organismos em todos os meios de cultura, mesmo quando duas coletas foram feitas em datas diferentes. A análise da água proveniente do destilador não apresentou contaminação, indicando que a estocagem favoreceu a contaminação da água. A água da torneira demonstrou baixo índice de contaminação. O meio R2A foi o mais eficiente na detecção de micro-organismos, conforme é apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Análise da qualidade da água armazenada para uso na Clínica de Dentística/Endodontia.

	R2A*	PCA*	PD*	SDA*
Reservatório de água destilada (13/06/2011)	148.300	15.440	18.000	0
Reservatório de água destilada (12/08/2011)	272.000	132.000	204.000	80
Destilador (12/08/2011)	0	0	0	0
Torneira (12/08/2011)	80	0	0	0

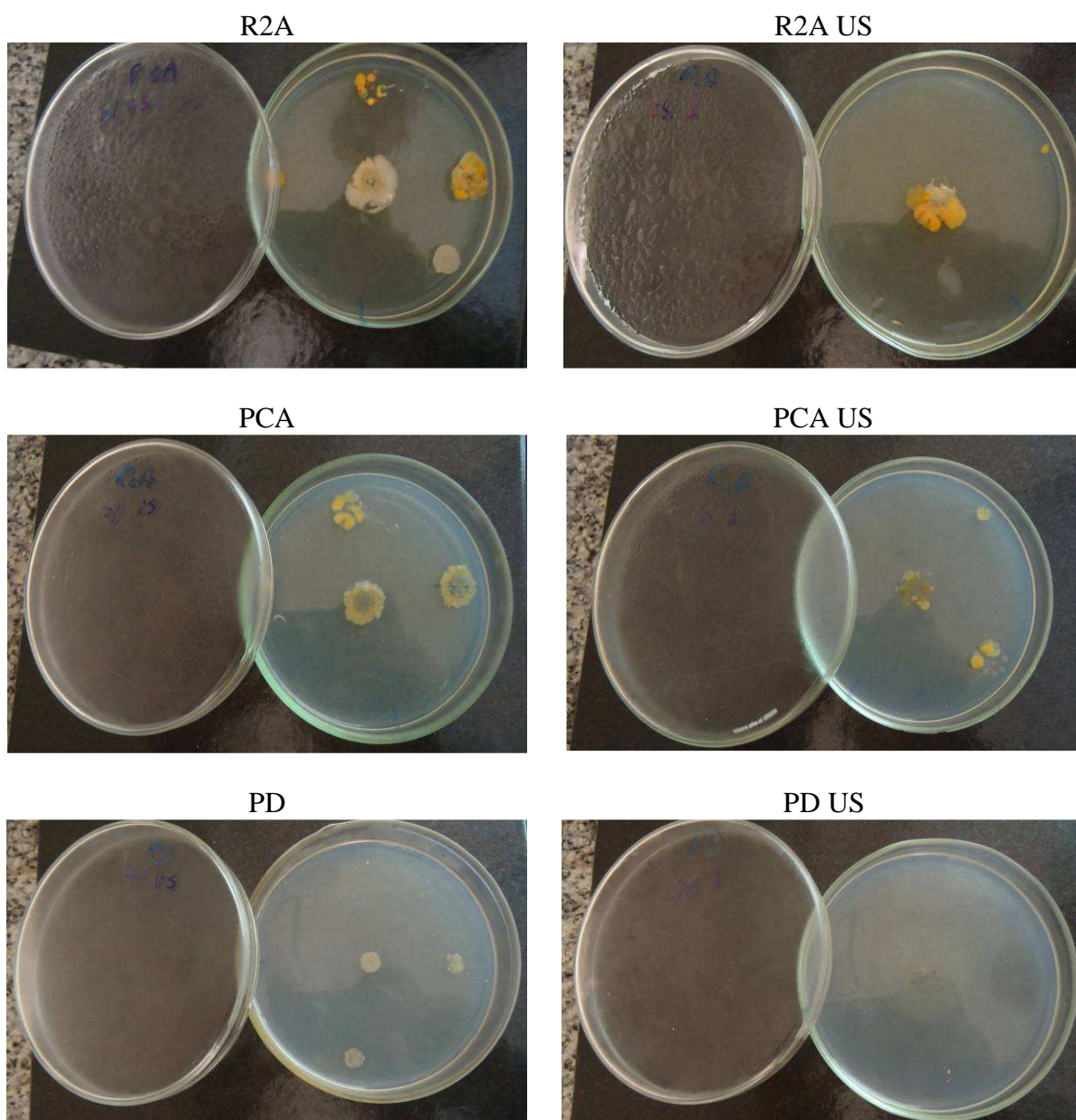
* Valores referente à UFC/ml

Gráfico 3 - Análise da qualidade da água armazenada para uso nos reservatórios da clínica de Dentística/Endodontia da FOB-USP.



Foram isoladas 113 colônias das quais 107 (94,69%) eram bacilos gram-negativos e 06 (5,31%) cocos gram-negativos que foram isolados dos meios R2A e PCA. No total das 81 colônias estocadas, como bacilos gram-negativos, 30 (37,03%) foram obtidos do meio R2A, outras 35 (43,21%) do PCA e 16 (19,75%) foram provenientes do PD.

Figura 1. Presença de UFC/ml detectadas nos meios R2A, PCA e PD, antes e após o US.



5.2. Fungos

A tabela com os dados de quantificação de UFC/ml de fungos é apresentada no **ANEXO B**. Foi constatada a presença de fungos em 20 (80%) reservatórios e em 12 (48%) após a ação do US. Dos 25 reservatórios avaliados não foram detectados fungos em 3 (12%) reservatórios (R15, R16 e R21), em 10 (40%) após a ação do US não foi detectado a presença, em 2 (8%) houve a detecção somente após o US e, em 10 (40%) em ambas avaliações foram confirmadas a presença de fungos, indicando que o US foi eficaz em reduzir o número de UFC/ml, sem eliminar o biofilme por completo.

Dos 25 reservatórios analisados, fungos foram detectados em 22 (88%), dos quais 43 colônias foram isoladas, sendo 32 (74,42%) antes e 11 (25,58%) após a ação do US. Com relação à morfologia celular, 41 (95,35%) eram filamentosas e 2 (4,65%) leveduriformes (R11 e R19). Em relação aos fungos detectados, 17 (68%) apresentaram maior número de UFC/ml antes da ação do US, em 2 (8%) houve aumento após o uso do US (R3 e R22) e, em 3 (12%) a contaminação foi detectada em ambas situações (R2, R12, R24).

Nos 22 reservatórios foram identificados nove gêneros: o *Penicillium sp* detectado em 9 (36%), o *Cladosporium sp* e *Exophiala sp* foram encontrados em 6 (24%) cada um. Os demais, *Acremonium sp* (16%), *Candida sp* (4%), *Candida albicans* (4%), *Paecilomyces sp* (12%), *Rhinochrysiella sp* (16%), *Trichoderma sp* (8%). O *Verticillium sp* foi encontrado somente no reservatório de estoque de água destilada, usado para a distribuição nos reservatórios de água dos equipos da Clínica de Dentística/Endodontia, porém, em nenhum dos equipos esse agente foi detectado.

O reservatório R23 apresentou maior diversidade de fungos, sendo encontrados 4 tipos, *Paecilomyces sp*, *Penicillium sp*, *Cladosporium sp* e *Acremonium sp*. As colônias de todos os fungos obtidos nos reservatórios indicaram que dentre eles, 13 reservatórios (R1, R3, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R17, R18, R19 e R20) apresentaram apenas 1 espécie onde prevaleceu o fungo do gênero *Penicillium sp* seguido por *Exophiala sp* e o *Cladosporium sp*.

Figura 2. Fotos do macro e microcultivos de fungos isolados dos 22 reservatórios da Clínica de Dentística/Endodontia – FOB/USP.

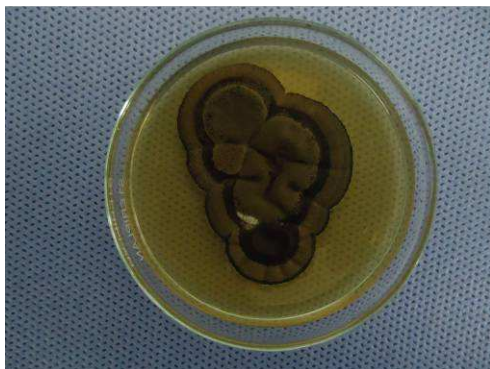


Figura 1A

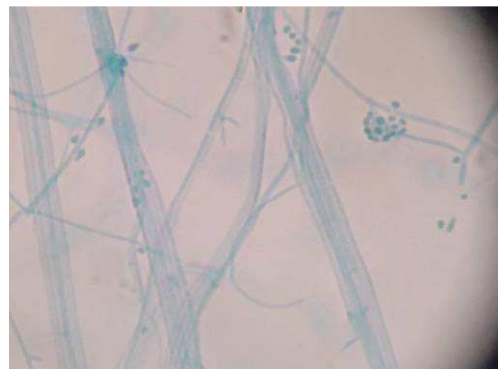


Figura 1B



Figura 2A

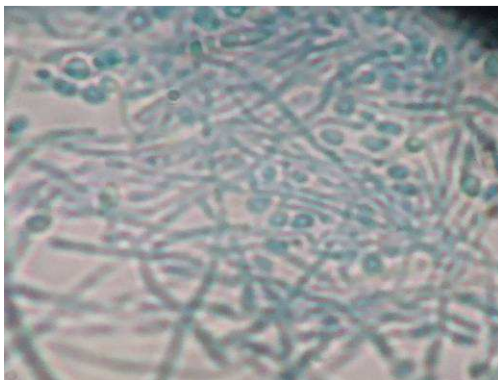


Figura 2B



Figura 3A



Figura 3B



Figura 4A

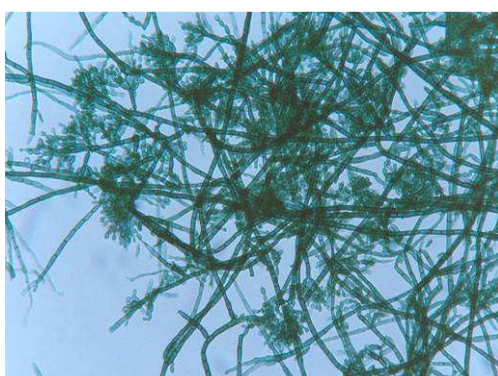


Figura 4B

Figura 2. Fotos do macro e microcultivos de fungos isolados dos 22 reservatórios da Clínica de Dentística/Endodontia – FOB/USP.



Figura 5A

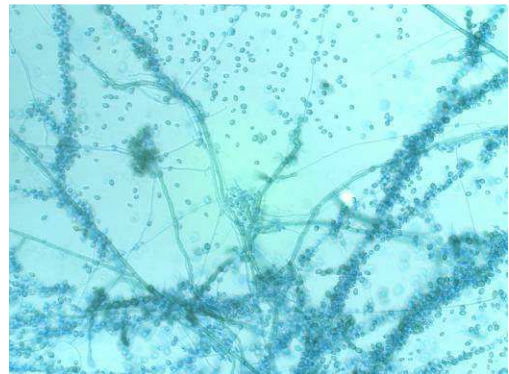


Figura 5B

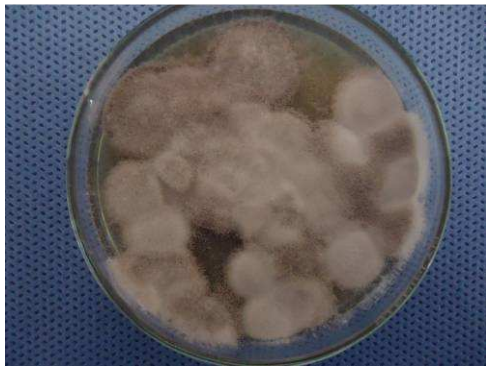


Figura 6A

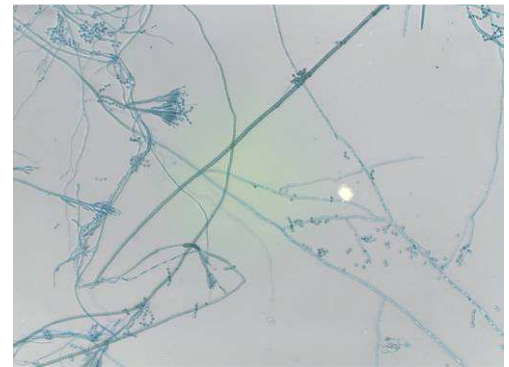


Figura 6B



Figura 7A

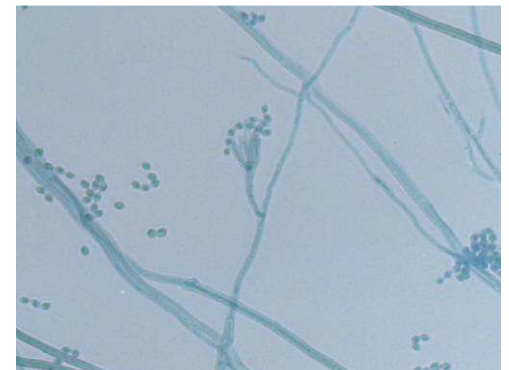


Figura 7B

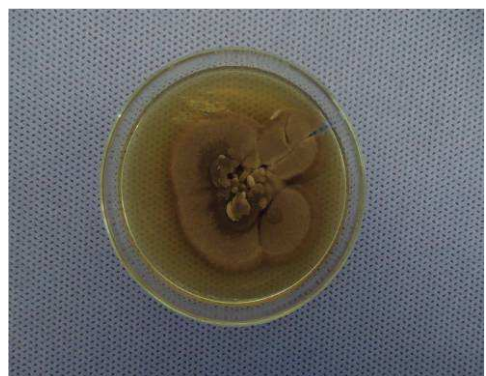


Figura 8A



Figura 8B

Figura 2. Fotos do macro e microcultivos de fungos isolados dos 22 reservatórios da Clínica de Dentística/Endodontia – FOB/USP.

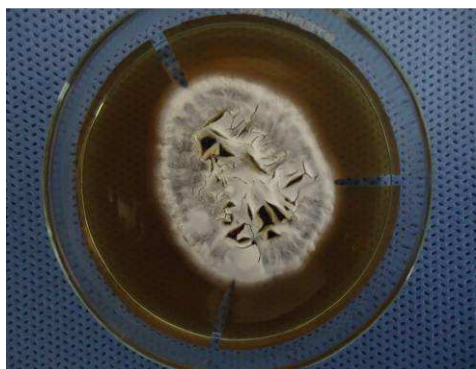


Figura 9A



Figura 9B



Figura 10A

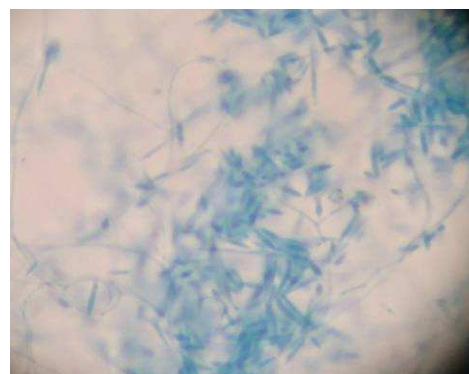


Figura 10B

Legenda: 1- *Acremonium sp*, 2- *Candida sp*, 3- *Candida albicans*, 4- *Cladosporium sp*,
5- *Exophiala sp*, 6- *Penicillium sp*, 7- *Paecilomyces sp*, 8- *Rhinochadiella sp*,
9- *Trichoderma sp*, 10- *Verticillium sp*.

A – Macrocultivo

B- Microcultivo

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a efetividade do ultrassom (US) em controlar ou reduzir a presença de biofilme no interior dos reservatórios de água de 25 equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (FOB-USP). As unidades selecionadas para esta pesquisa foram instaladas em 2001, com um período de 10 anos de uso, em que a água destilada sempre foi empregada no abastecimento dos reservatórios destes equipos.

Os números de UFC/ml detectados nos reservatórios demonstraram a presença de elevados níveis de micro-organismos na maioria dos equipos, com ampla variação em cada unidade. O agar PD detectou de 1.040.000 a 240 UFC/ml ($X=245.824$ UFC/ml), o meio de cultura R2A de 440.000 a 0 UFC/ml ($X=173.787$ UFC/ml) e o PCA de 560.000 a 0 UFC/ml ($X=104.873$ UFC/ml), confirmam os relatos da literatura que apontam este local como fonte de contaminação. Com a utilização do US os números variaram de 280 a 212.000 UFC/ml para o R2A, de 80 a 44.000 UFC/ml para o PCA e de 360 a 124.000 UFC/ml para o PD. Alguns autores relataram um número elevado de micro-organismos em seringas tríplices, canetas de alta rotação e reservatórios de equipos odontológicos, tais como Gross, Devine, Cutright (1976) com 3.200 a 5.600.000 UFC/ml, Williams et al. (1993) com 400 a 1.000.000 UFC/ml, Prevost et al. (1995) com 5.700 a 3.300.000 UFC/ml, Souza-Gugelmin et al. (2003) com até 610.000.000 UFC/ml e Watanabe et al. (2006a) com até 10.000.000 UFC/ml.

Vários autores ressaltam a importância da qualidade da água nos ductos e reservatórios de equipos odontológicos visando à prevenção de contaminações e possíveis infecções que possam afetar os pacientes (SZYMANSKA, 2006; WATANABE, 2007 e COLEMAN et al., 2007). A água presente nos reservatórios odontológicos tem que ter um padrão de qualidade exigida por órgãos competentes, tais como a ADA (1996), que preconiza uma tolerância de contaminantes de até 200 UFC/ml, no Brasil esse valor é estabelecido pelo Ministério da Saúde que aceita até 500 UFC/ml (BRASIL, 2011) para o consumo humano. Nenhum dos reservatórios apresentou as condições preconizadas pela ADA e somente em 1 (4%) reservatório 16 (R16) apresentou menos de 500 UFC/ml.

Micro-organismos foram detectados em todos os 25 reservatórios submetidos à ação do US, quando foi usado o meio PCA, com contagens que variaram de 80 a 560.000 UFC/ml

($X=3.034$ UFC/ml), em 24 (96%) casos para o meio R2A que apresentou de 280 a 212.000 UFC/ml ($X= 15.841$ UFC/ml) e, em 23 (92%) unidades para o emprego do PD, sendo observado uma contagem de 360 a 124.000 UFC/ml ($X= 8.231$ UFC/ml), indicando a redução do biofilme, sem a sua completa eliminação. Fato semelhante foi observado por Zhang et al. (2007) que aplicaram 500 ml da solução Sterilox, recém preparada, por um período de 8 horas e, a seguir, 300 ml foram passados através das tubulações e, posteriormente foi usado uma solução a 2%, durante um período de 5 anos, uma vez por semana. A redução do biofilme ocorreu, mas não foi eliminado por completo. Foram usados os meios R2A, incubando a 22° C e o agar TSB, incubado a 37° C por 48 horas, para quantificar o número de UFC/ml.

A qualidade da água usada para abastecer os reservatórios é de fundamental importância e, geralmente, água destilada tem sido recomendada. Porém é vulnerável a contaminação e pode facilmente tornar fonte de novos micro-organismos. A água destilada quando produzida está livre de contaminação, porém seu armazenamento favorece o desenvolvimento do biofilme, como foi verificado nesta pesquisa (tabela 3). Fato semelhante foi constatado por Zhang et al. (2007), que ao analisarem 39 amostras de água provenientes do mesmo destilador, verificaram em 15,4% menor número do que 200 UFC/ml, em outros 15,4% houve de 552 a 42.240 UFC/ml e, em 69,2%, não estavam contaminadas. Dos 84% dos reservatórios que estavam contaminados, apresentaram uma média de $8,1 \times 10^4$ UFC/ml.

A água proveniente da torneira apresentou 80 UFC/ml, valor aceito por nossa legislação (500 UFC/ml), entretanto ficou aquém do que é preconizado na Europa, ou seja, menor que 100 UFC/ml a 22° C e menos que 20 UFC/ml a 37° C (COUNCIL DIRECTIVE, 1998). Verificamos que as condições de armazenamento da água não foram satisfatórias e que uma avaliação microbiológica deve ser feita com maior frequência, bem como observar alguns cuidados no preenchimento dos reservatórios, a fim de garantir a qualidade da água. Willians (1993) havia demonstrado que a qualidade da água dos reservatórios estava comprometida e imprópria para uso, sendo isto confirmado nesta pesquisa e em outros estudos (PREVOST et al., 1995; WATANABE, 2003; AGOSTINHO, 2004; WATANABE, 2007).

Para contagem total de bactérias, o meio de PD se mostrou mais eficaz na quantificação de UFC/ml do que o R2A e o PCA antes do US, e o meio R2A foi o mais eficaz na recuperação de UFC/ml após a ação do US como consta no anexo A.

Reasoner (1990) demonstrou que o meio PCA quando comparado ao R2A em diferentes temperaturas obteve uma recuperação de UFC/ml inferior, o que sugere que o emprego deste meio pode favorecer as contagens subestimadas, isso foi verificado nesta pesquisa para a quantificação de bactérias planctônicas. O PCA apresentou menor quantificação de micro-organismos quando comparados aos demais meios de cultura, embora tenha sido utilizado por vários autores para análise de água (REASONER, 1990; ARAUJO e LOPES-SILVA, 2002; FRANZIN; CABODI; FANTINO, 2002).

Fiksdal et al.(1982) analisaram a qualidade da água utilizando a técnica da membrana filtrante e semeando nos meios R2A, CPS, m-SPC, SMA e PD, que foram incubados a 20 ou 35° C por vários períodos. Os autores relataram que o PD tem uma quantidade inferior de nutrientes quando comparado ao meio ao R2A, no entanto permitiu um melhor desenvolvimento de micro-organismos de crescimento lento, tendo suas características morfológicas mais acentuadas, fato que constatamos em nosso estudo.

Maki et al. (1986) compararam os meios R2A, Standard Methods Agar (SMA), Caseina-Peptone-Starch Agar (CPS) e PD para quantificar bactérias de água do sistema de distribuição de Seattle. As amostras estavam cloradas e foram incubadas a 20° C por um período de 28 a 30 dias. Algumas placas com os meios PD e CPS foram incubadas a 10, 20 e 30° C e quantificadas após o mesmo período descrito acima. Das 8 amostras verificadas, em 7 o PD obteve contagens superiores a todos os outros meios, inclusive o R2A; apenas em uma amostra o R2A se equiparou ao PD. Nosso estudo corrobora os dados obtidos por Maki et al. (1986), entretanto, é importante salientar que os reservatórios em nosso estudo foram abastecidos com água destilada.

Reasoner e Geldreich (1985) demonstraram que embora o PCA seja muito utilizado para cultivo de bactérias de água (35° C por 48 horas), é um meio que não permite a contagem de muitas bactérias, subestimando a população microbiana existente na amostra. Os autores relataram que o meio R2A é o mais indicado para o cultivo de bactérias de água (BARBEAU et al., 1996; HALLAM et al., 2001; YABUNE; IMAZATO; EBISU, 2005), o que nos motivou a fazer a comparação destes três meios na avaliação da água presente nos reservatórios.

Massa et al. (1998) usaram os meios R2A e PCA para a quantificar bactérias heterotróficas utilizando a técnica *pour plate* após as amostras serem incubadas a 22° C por 3,

5 e 7 dias. Os resultados demonstraram que em todos os períodos de incubação as contagens de bactérias no meio de cultura R2A foram superiores ao PCA e, no presente estudo, o mesmo foi observado, entretanto a temperatura foi de 24°C por 3 dias e foi empregada a técnica da gota.

Nosso estudo utilizou a técnica da gota que é de fácil aplicação e permite semear na mesma placa, em pontos diferentes, várias diluições, o que reduz o número de placas de petri a serem utilizadas. Esta técnica não requer temperatura de 55° C como a técnica de *pour plate*, que consiste em verter meio de cultura sobre a amostra a ser analisada (REASONER, 1990; MASSA et al., 1998; HALLAM et al., 2001). Westergren e Krasse (1978) utilizaram essa técnica para quantificar colônias de *Streptococcus mutans* em Ágar Mitis Salivarius e de *Lactobacillus* em Ágar Rogosa-SL.

A temperatura e o tempo de incubação são fundamentais no crescimento microbiano. No presente trabalho utilizamos a incubação a 24° C por 72 horas. Ampla variação foi encontrada para o uso dos meios, tempo e temperatura de incubação, tais como: Araujo e Lopes-Silva (2002) trabalharam com meio PCA a uma temperatura de 35° C por 48 horas, Barbeau et al. (1996) utilizaram o R2A a 25-37° C por 24 até 48 horas, enquanto, Franzin; Cabodi e Fantino (2002) utilizaram o PCA a 37°C por 72 horas e também a 25° C por 120 horas, Furuhashi e Miyamae (1985) trabalharam com TSA a 32° C por 48 horas a 10 dias e Grenier (1995) utilizou meio TSA suplementado com sangue humano e incubou suas amostras a 37° C por 7 dias.

Reasoner (1990) demonstrou que em diferentes temperaturas há alteração do crescimento bacteriano. Utilizou os meios PCA e R2A, com incubação a 20, 26, 28 e 35°C por 5 a 7 dias. A temperatura e o tempo de processamento podem influenciar no crescimento dos micro-organismos e que a análise imediata da amostra pode evitar esse problema (PALENIK; BURGESS e MILLER, 2005); o início do processamento das nossas amostras de água não excedeu 30 minutos.

Não há uma padronização para quantificar a presença de bactérias na água dos reservatórios e que permita a comparação entre os resultados da literatura. Verificamos que os meios foram eficazes na detecção de bactérias planctônicas, entretanto o PD quantificou maior número de UFC/ml, seguido pelo R2A e PCA como é demonstrado no ANEXO A. Após a aplicação do US, o R2A apresentou uma maior recuperação de bactérias do que o

meio PD, seguido pelo PCA. Uma possível explicação para estas alterações pode ser a quantidade de nutrientes que os meios apresentam, sendo o PD o de menor valor, o R2A pode ser considerado como intermediário e o PCA o com maior quantidade de nutrientes, fato de extrema importância para micro-organismos que utilizam a água como fonte de nutrição (FIKSDAL et al., 1982; REASONER; GELDREICH, 1985; MAKI et al., 1986; MASSA et al., 1998).

No presente trabalho os bacilos gram-negativos prevaleceram, fato que é confirmado por outras pesquisas feitas por Furuhashi e Miyamae (1985) que constataram a prevalência em suas amostras, de *Pseudomonas sp* e *Alcaligenes faecalis*. Williams et al. (1993) encontraram as espécies *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Flavobacterium sp*, *Sphingomonas* e *Brevundimonas vesicularis*. Shepherd et al. (2001) detectaram *Alcaligenes sp*, *Brevundimonas vesicularis* e *Xanthomonas*. Szymanska (2003) relatou prevalência de *Sphingomonas paucimobilis* em biofilmes provenientes de linhas de água de equipos odontológicos, assim como *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas vesicularis* e *Alcaligenes faecalis*. Ainda Szymanska (2006) e Williams et al. (1993) encontraram a bactéria *Ralstonia pickettii*. Watanabe, Pimenta e Ito (2007) identificaram *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevundimonas vesicularis* e *Burkholderia cepacia*. Sheperd et al. (2001) detectaram a presença de bacilos gram-negativos como *Sphingomonas sp*, *Flavobacterium sp*, *Xanthomonas sp* e *Pseudomonas sp*, utilizando o R2A. Coleman et al. (2007) relataram ser a maioria de suas amostras formada de bacilos gram-negativos e verificaram elevada quantidade de endotoxina (LPS). Szymanska (2007) relatou em seu trabalho a existência de bactérias gram-negativas tais como *Brevundimonas vesicularis* (*Pseudomonas*), *Moraxella lacunata*, *Moraxella sp*, *Ralstonia pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*).

O biofilme é uma comunidade altamente complexa, formada por bactérias organizadas junto a outros tipos de seres vivos, como algas e protozoários, demonstrando alta complexidade em sua estruturação, podendo envolver várias espécies (COSTERTON et al., 1987; STOODLEY et al., 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Hallam et al. (2001) constataram que a população microbiana aumenta à medida que a presença de cloro se reduz, havendo a necessidade de pelo menos 21 dias para que o biofilme se estruture.

Em um biofilme há diferenças na expressão de moléculas, resistência a antibióticos, fatores de virulência e utilização de nutrientes (BAGGE et al., 2004; LENZ et al., 2008). As bactérias coordenam a comunicação entre suas células, sendo esse processo conhecido como Quorum Sensing (QS) conforme o relatado por Hall-Stoodley e Stoodley (2009), também são favorecidas por se aglomerarem e secretarem uma matriz que irá garantir a sobrevivência das outras células em situações desfavoráveis. Essa matriz composta de substâncias poliméricas extra-celulares (SPE) retêm a presença de DNA, proteínas enzimas e lipídios (FLEMMING; WINGENDER, 2010) garantindo a sobrevivência dos micro-organismos.

A análise da água do reservatório de armazenamento de água destilada, usada para abastecer os equipos da Clínica Dentística/Endodontia, demonstrou que a estocagem favoreceu o desenvolvimento do biofilme e a limpeza periódica (semanal) torna-se fundamental, enquanto os fabricantes não melhorarem a estrutura e condições dos reservatórios e tubulações de água para não favorecer desenvolvimento do biofilme, conforme foi proposto por Coleman et al. (2007).

7 *Conclusão*

7 CONCLUSÕES

Os dados analisados permitem concluir que:

- Os níveis de contaminação da água dos reservatórios dos equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP foi elevado.
 - O ultrassom foi eficaz em desagregar o biofilme dos reservatórios de água, no entanto, não foi suficiente para removê-lo por completo.
 - Todos os meios de cultura: R2A, PCA, PD e SDA com 1% de cloranfenicol foram capazes de detectar micro-organismos quando incubados a temperatura de 24° C por 72 horas.
 - Bacilos (94,69%) e cocos (5,31%) gram-negativos foram encontrados nos reservatórios de água da Clínica de Dentística/Endodontia, assim como fungos filamentosos (95,34%) e leveduriformes (4,66%).
 - Foram identificados 9 gêneros de fungos: *Penicillium sp*, *Cladosporium sp*, *Exophiala sp*, *Acremonium sp*, *Candida sp*, *Paecilomyces sp*, *Rhinochrysiella sp* e *Trichoderma sp*. O *Verticillium sp* foi encontrado somente no reservatório de estoque de água destilada, usado para a distribuição na Clínica de Dentística/Endodontia.
-
-

Referências

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. M. **Biocidas da desinfecção de linhas d'água de equipamentos odontológicos: avaliação química, microbiológica e por MEV.** 2004, 111 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2004.

AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T. Avaliação bacteriológica da qualidade de água utilizada nos equipamentos odontológicos. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 228-235, maio/jun. 1999.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ADA statement on dental unit waterlines. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 127, n. 11, p. 185-186, Nov. 1996.

ARAÚJO, C. M.; LOPES-SILVA, A. M. S. Análise da qualidade de água de reservatórios de equipamentos odontológicos. **Rev Biociênc**, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 21-28. jan./jun. 2002.

ARVANITIDOU, M. et al. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. **Lett Appl Microbiol**, Washington, v. 29, n. 1, p. 81-84, July 1999.

BAGGE, N. et al. Dynamics and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1168-1174, Apr. 2004.

BARBEAU, J. et al. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental unit water. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 62, n. 11, p. 3954-3959, Nov. 1996.

BLAKE, G. C. The incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. **Br Dent J**, London, v. 115, p. 413-446, Nov. 1963.

BRASIL. Ministério da saúde. **Portaria nº 518 de 29 dez. 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. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <
<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>> Acesso em: 01 jun. 2011.

CARDOSO, M. L. et al. Qualidade microbiológica da água utilizada em turbinas de alta rotação em três condições clínicas diferentes. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 387-393, set./out. 1999.

CHIBEBE, P. C. A.; UENO, M.; PALLOS, D. Biossegurança: avaliação da contaminação da água de equipamentos odontológicos. **Rev Biociênc**, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 53-59, jan/jun. 2002.

COLEMAN, D. C. et al. The role of manufacturers in reducing biofilms in dental chair waterlines. **J Dent**, Bristol, v. 35, n. 9, p. 701-711, Sept. 2007.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, CA, v. 41, p. 435-464, 1987.

COUNCIL Directive 98/83/EC of 3 november 1998 on the quality of water intend for human consumption. **Official J Eur Commun**, Louxembourg, v. 41, n. L330, p. 32-54, Dec. 1998. Disponível em: < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/2008.LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>>

DOLCI, G.; MONTEBUGNOLI, L. The croos-infection control in medical devices for dentistry. In: DOLCI, G.; MONTEBUGNOLI, L. eds. CONGRESSO NAZIONALE DEL "COLEEGIO DEI DOCENTI DI ODONTOIATRIA", 7., 2000, Roma. **Proceedings...** Roma, 2000. v. 2, p. 11-34.

DOMINGOS, R. N. **Contribuições e usos do ultrassom de média intensidade no preparo de catalizadores e produção ativada de etanol**. Rio Claro, 1998. Tese (Livre Docente em Termodinâmica) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas - UNESP - Rio Claro (SP), 1998.

FANTINATO, V. et al. Exame bacteriológico da água em clínica odontológica. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 829-831, jul./ago. 1992.

FIKSDAL, L. et al. Non standard methods for enumerating bacteria in drinking water. **J Am Water Works Assoc**, Denver, v. 74, n. 6, p. 313-318, June 1982.

FLEMMING, H. C. Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, n. 6, p. 629-640, Sept. 2002.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 8, n. 9, p. 623-633, Sept. 2010.

FRANZIN, L.; CABODI, D.; FANTINO, C. Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by Legionella. **J Hosp Infect**, New York, v. 51, n. 4, p. 269-274, Aug. 2002.

FURUHASHI, M; MIYAMAE, T. Prevention of bacterial contamination of water in dental units. **J Hosp Infect**, London, v. 6, n. 1, p. 81-88, Mar. 1985.

GRENIER, D. Quantitative analysis of bacterial aerosols in two different dental clinic environments. **Appl Environment Microbiol**, Washington, v. 61, n. 8, p. 3165-3168, Aug. 1995.

GROSS, A.; DEVINE, M. J.; CUTRIGHT, D. E. Microbial contamination of dental units and ultrasonic scalers. **J Periodontol**, Chicago, v. 47, n. 11, p. 670-673, Nov. 1976.

GUIMARÃES J. J. **Biossegurança e controle de infecção cruzada em consultórios odontológicos**. São Paulo: Ed. Santos, 2001. p 83-110.

HALLAM, N. B. et al. The potential for biofilm growth in water distribution systems. **Water Res**, Oxford, v. 35, n. 17, p. 4063-4071, Dec. 2001.

HALL-STOODLEY, L. H.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell Microbiol**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1034-1043, July 2009.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 2, n. 2, p. 95-108, Feb. 2004.

ITO, I. Y. et al. Biossegurança: PetrifilmTM no exame microbiológico da água de equipo odontológico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, 16, 1999, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: Divisão Brasileira da IADR, 1999. p. 7.

JENSEN, P.Ø. et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, New York, v. 153, p. 1329-1338, 2007.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol Mol Biol Rev**, Washington, v. 73, n. 2, p. 310-347, June 2009.

KETTERING, J. D. et al. Reducing bacterial counts in dental unit waterlines: distilled water vs. antimicrobial agents. **J Calif Dent Assoc**, Sacramento, v. 30, n. 10, p. 735-741, Oct. 2002.

KIM, P. J.; CEDERBERG, R. A.; PUTTAIAH, R. A pilot study of 2 methods for control of dental unit biofilms. **Quintessence Int**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 41-48, Jan. 2000.

LENZ, A. P. et al. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 74, n. 14, p. 4463-4471, July, 2008.

MAKI, J. S. et al. Recovery and diversity of heterotrophic bacteria from chlorinated drinking water. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1047-1055, May 1986.

MASSA, S. et al. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. **World J Microbiol Biotechnol**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 727-730, May 1998.

MAYO, J. A.; OERTLING, K. M.; ANDRIEU, S. C. Bacterial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes. **Clin Prev Dent**, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 13-20, Jan./July 1990.

MILLS, S. E.; LAUDERDALE, P. W.; MAYHEW, R. B. Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 113, n. 2, p. 280-284. Aug. 1986.

MONTEBUGNOLI, L. et al. Detection of DNA from periodontal pathogenic bacteria in biofilm obtained from waterlines in dental units. **New Microbiol**, Pavia, v. 27, n. 4, p. 391-397, Oct. 2004.

O'DONNELL, M. J. et al. Bacterial contamination of dental chair units in a modern dental hospital caused by leakage from suction system hoses containing extensive biofilm. **J Hosp Infect**, London, v. 59, n. 4, p. 348-360, Apr. 2005.

PALENIK, C.J.; BURGESS, K.H.; MILLER, C.H. Effects of delayed microbial analysis of dental unit water line specimens. **Am J Dent**, San Antonio, v.18, n.2, p. 87-90, Apr. 2005

PANKHURST, C. L.; PHILPOTT-HOWARD, J. N. The microbiological quality of water in dental chair units. **J Hosp Infect**, London, v. 23, n. 3, p. 167-174, Mar. 1993.

PHULL, S. S. et al. The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. **Ultrason Sonochem**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 157-164, Apr. 1997.

PREVOST, A. P. et al. Doctor, would you drink water from your dental unit? **New York State Dent J**, New York, v. 61, n. 10, p. 22-28, Dec. 1995.

PUTNINS, E. E.; DI GIOVANNI, D.; BHULLAR, A. S. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. **J Periodontol**, Chicago, v. 72, n. 3, p. 393-400, Mar. 2001.

REASONER, D. J. Monitoring heterotrophic bacteria in potable water. In: McFETERS, G. A. (ed.). **Drinking water microbiology: progress and recent developments**. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 452-477.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 49, n. 1, p. 1-7, Jan. 1985.

ROBERTS, H. W., KARPAY, R. I.; MILLS, S. E. Dental unit waterline antimicrobial agents' effect on dentin bond strength. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 131, n. 2, p. 179-183, 2000.

SCHERBA, G., WEIGEL, R. M., O'BRIEN JR, W. D. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 57, n. 7, p. 2079, 1991.

SHEARER, B. G. Biofilm and the dental office. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 127, n. 2, p. 181-189, Feb. 1996.

SHEPHERD, P. A. et al. Clearance of biofilms from dental unit waterlines through the use of hydroperoxide ion-phase transfer catalysts. **Quintessence Int**, Berlin, v. 32, n. 10, p. 755-761, Nov./Dec. 2001.

SOUZA-GUGELMIN, M. C. M. et al. Microbial contamination in dental unit waterlines. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 55-57, Mar. 2003.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, CA, v. 56, p. 187-209, 2002.

SZYMANSKA, J. Control method of microbial water quality in dental unit waterlines. **Ann Agric Enviromen Med**, Lublin, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2003.

SZYMANSKA, J. Bacterial decontamination of DUWL biofilm using Oxygenal 6. **Ann Agric Environ Med**, Lublin, v. 13, n. 1, p. 163-167, Jan./June 2006.

SZYMANSKA, J. Bacterial contamination of water in dental unit reservoirs. **Ann Agric Environ Med**, Lublin, v. 14, p. 137-140, 2007.

TAYLOR-HARDY, T. L. et al. Effect of dental unit waterline biocides on enamel bond strengths. **Gen Dent**, Chicago, v. 49, n. 4, p.421-425, July/Aug. 2001.

TIPPETT, B. F.; EDWARDS, J. L.; HOWARD, F. J. Bacterial contamination of dental unit water lines-a possible source of cross-infection. **N Z Dent J**, Dunedin, v. 84, n. 378, p. 112-113, Oct. 1988.

WATANABE, E. **Avaliação do nível de contaminação da água de equipo odontológico**. Ribeirão Preto, 2003. 113f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WATANABE, E. **Água do equipo odontológico: técnicas convencionais e modernas para avaliar a contaminação microbiana**. 2007.142f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, São Paulo, 2007.

WATANABE, E.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y. Determinação do nível de contaminação microbiana da água de equipos odontológicos utilizando Petrifilm™ e SimPlate® WHPC. **STOMA**, Lisboa, v. 82, p. 11-15, 2007.

WATANABE, E. et al. Evaluation of fungi contamination level from dental unit water using Petrifilm™ YM. **STOMA**, Lisboa, n. 76, p. 47-51, jul./set. 2005.

WATANABE, E. et al. Avaliação do nível de contaminação microbiana da água de equipo odontológico pelo método Petrifilm™. **Rev Biociên**, Taubaté, v. 12, n. 1-2, p. 68-75, 2006 a.

WATANABE, E. et al. Diferentes métodos de avaliação do nível de contaminação microbiana da água de alta rotação. **ROBRAC**, Goiânia, v. 15, n. 40, 2006b.

WESTERGREEN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 7, n. 1, p. 82-83, Jan. 1978.

WHITEHOUSE, R. L. et al. Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. **J Dent**, Bristol, v. 19, n. 5, p. 290-295, Oct. 1991.

WILLIAMS, H. N. Contribution of biofilm bacteria to the contamination of the dental unit supply. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 126, n. 9, p. 1255-1260, Sept. 1995.

WILLIAMS, J. F. et al. D. Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 124, n. 10, p. 59-65, Oct. 1993.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; CURT, H. **Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function**. Berlin: Springer, 1999.

YABUNE, T.; IMAZATO, S.; EBISU, S. Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 21, n. 8, p. 780-786, Aug. 2005.

ZHANG, W. et al. Evaluation of Sterilox for controlling microbial biofilm contamination of dental water. **Compendium**, Newtown, v. 28, n. 11, p. 586-592, Nov. 2007.

Apêndices

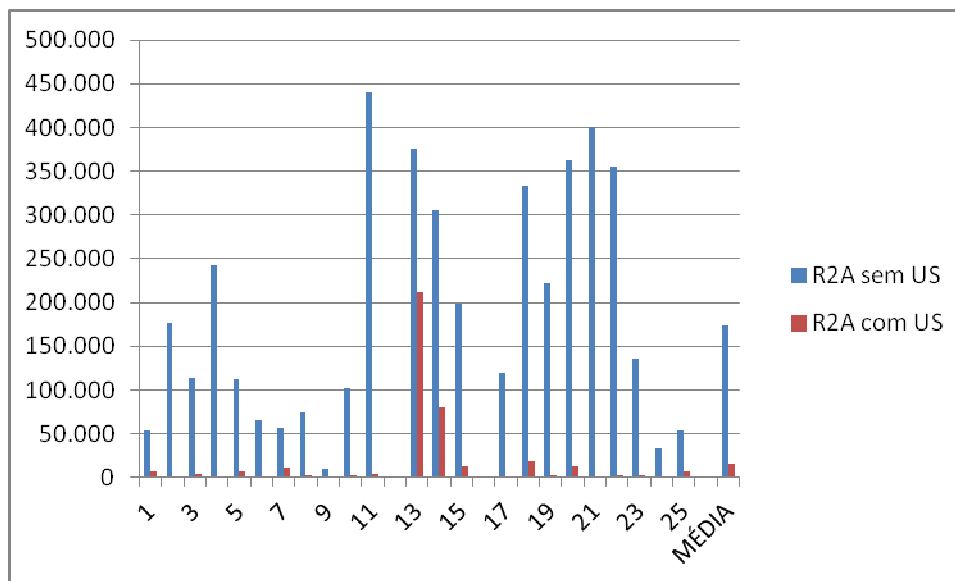
APÊNDICE A- Identificação dos fungos isolados nos reservatórios de água dos equipos odontológicos da Clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP.

Identificação dos Fungos				
Reservatório	Meio de cultura	Morfologia	US	Espécie
1	SDA	Filamentosa		<i>Exophiala sp</i>
2	SDA	Filamentosa		<i>Paecilomyces sp</i>
2	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
2	SDA	Filamentosa	US	<i>Paecilomyces sp</i>
2	SDA	Filamentosa	US	<i>Penicillium sp</i>
3	SDA	Filamentosa	US	<i>Cladosporuin sp</i>
4	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
4	SDA	Filamentosa	US	<i>Penicillium sp</i>
4	SDA	Filamentosa	US	<i>Cladosporuin sp</i>
4	SDA	Filamentosa	US	<i>Acremonium sp</i>
5	SDA	Filamentosa		<i>Exophiala sp</i>
6	SDA	Filamentosa		<i>Trichoderma sp</i>
6	SDA	Filamentosa	US	<i>Trichoderma sp</i>
7	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
8	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
9	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
10	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
10	SDA	Filamentosa	US	<i>Penicillium sp</i>
11	SDA	Leveduriforme	US	<i>Candida albicans</i>
12	SDA	Filamentosa		<i>Cladosporuin sp</i>
12	SDA	Filamentosa	US	<i>Exophiala sp</i>
13	SDA	Filamentosa		<i>Rhinochadiella sp</i>
13	SDA	Filamentosa	US	<i>Acremonium sp</i>
13	SDA	Filamentosa	US	<i>Penicillium sp</i>
14	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
14	SDA	Filamentosa		<i>Paecilomyces sp</i>
14	SDA	Filamentosa	US	<i>Cladosporuin sp</i>
17	SDA	Filamentosa		<i>Trichoderma sp</i>
18	SDA	Filamentosa		<i>Cladosporuin sp</i>
19	SDA	Leveduriforme		<i>Candida sp</i>
20	SDA	Filamentosa		<i>Rhinochadiella sp</i>
22	SDA	Filamentosa	US	<i>Rhinochadiella sp</i>
22	SDA	Filamentosa	US	<i>Exophiala sp</i>
23	SDA	Filamentosa		<i>Penicillium sp</i>
23	SDA	Filamentosa		<i>Paecilomyces sp</i>
23	SDA	Filamentosa		<i>Acremonium sp</i>
24	SDA	Filamentosa		<i>Exophiala sp</i>
24	SDA	Filamentosa	US	<i>Acremonium sp</i>
25	SDA	Filamentosa		<i>Exophiala sp</i>
25	SDA	Filamentosa		<i>Rhinochadiella sp</i>

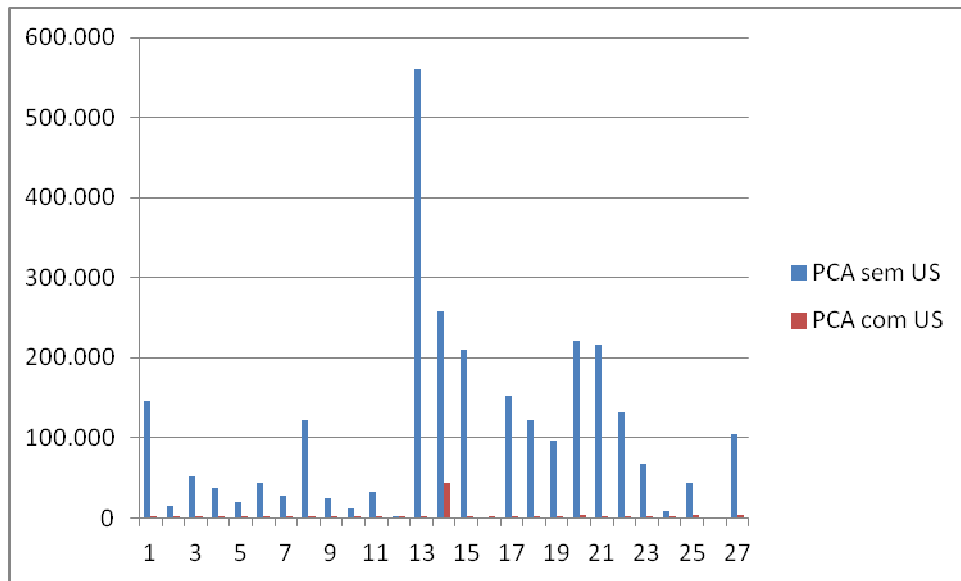
APÊNDICE B- Identificação dos fungos isolados no reservatório de estocagem de água destilada da Clínica de Dentística/Endodntia da FOB/USP.

Fungo	Rerservatório água destilada	Total
<i>Acremonium sp</i>		0
<i>Candida sp</i>		0
<i>Candida albicans</i>		0
<i>Cladosporium sp</i>		0
<i>Exophiala sp</i>		0
<i>Paecilomyces sp</i>		0
<i>Penicillium sp</i>		0
<i>Rhinocladiella sp</i>		0
<i>Trichoderma sp</i>		0
<i>Verticillium sp</i>	X	1

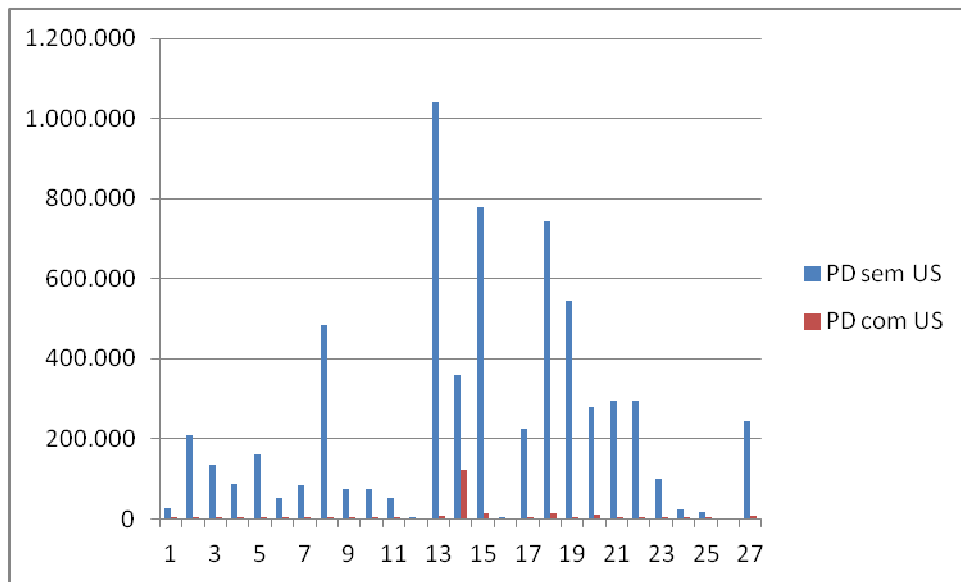
APÊNDICE C- Comparação entre o meio R2A e R2A com US.



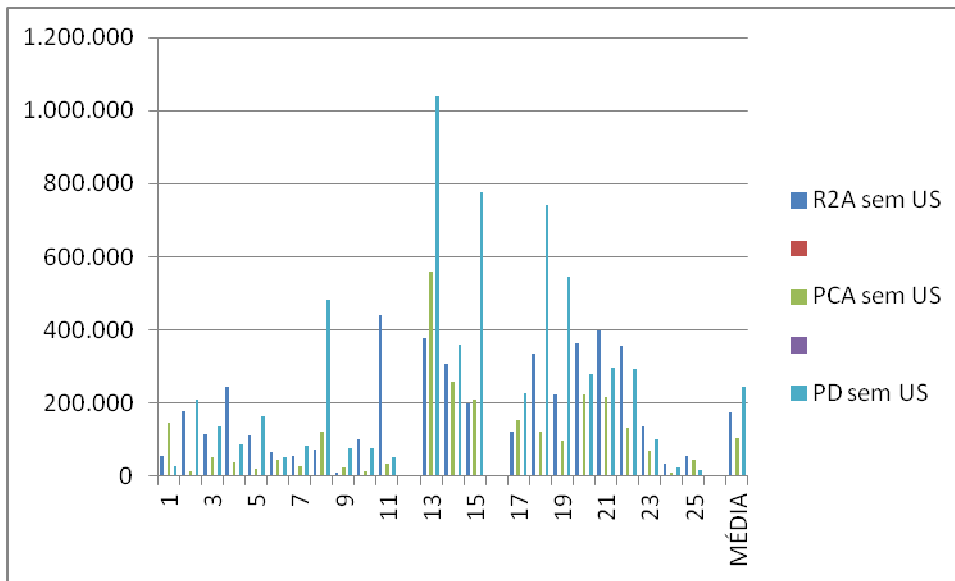
APÊNDICE D - Comparação entre o meio PCA e PCA com US.



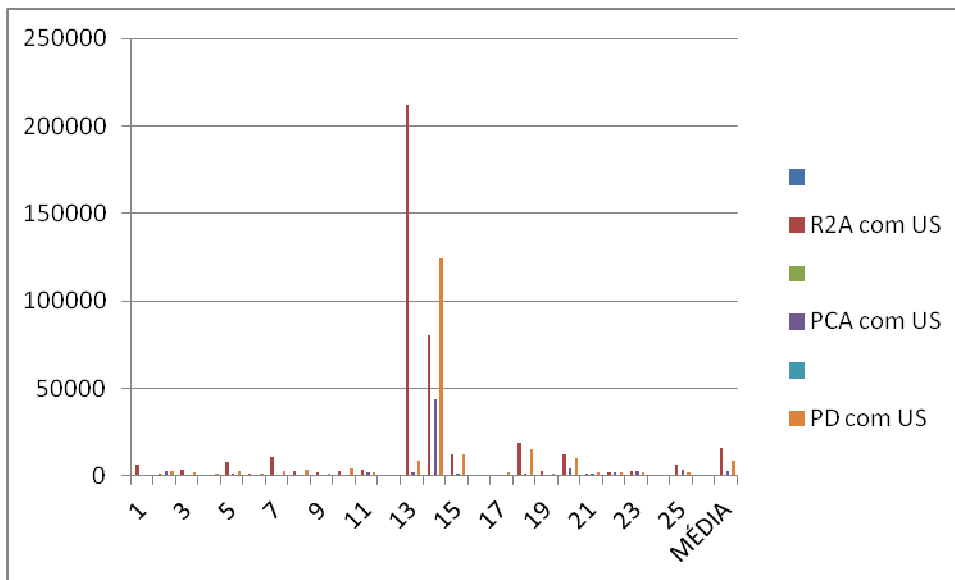
APÊNDICE E- Comparação entre o meio PD e PD com US.



APÊNDICE F - Comparação entre os meios R2A, PCA e PD sem a ação do US.



APÊNDICE G - Comparação entre os meios R2A, PCA e PD com a ação do US.



A*nexos*

ANEXO A- Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) de bactérias dos reservatórios de água da clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP nos diferentes tipos de meios de cultura antes e após o uso do ultrassom.

Reservatório (R)	R2A	R2A US	PCA	PCA US	PD	PD US
1	54.000	6.240	146.300	560	26.200	440
2	176.000	1.600	14.200	2.733	208.000	3.027
3	114.000	3.693	51.987	780	136.000	1.960
4	242.667	860	37.600	680	88.000	920
5	112.000	7.600	19.400	1.500	162.000	2.980
6	66.000	1.560	43.333	560	52.000	1.300
7	56.000	10.800	28.000	600	84.000	2.400
8	74.000	2.780	122.000	800	484.000	3.400
9	9.640	1.700	25.000	760	76.000	1.240
10	102.000	2.800	11.600	600	76.000	4.000
11	440.000	3.600	33.000	1.980	52.000	2.220
12	1.060	280	600	440	760	0
13	376.000	212.000	560.000	2.000	1.040.000	8.400
14	306.000	80.000	258.000	44.000	360.000	124.000
15	198.000	12.540	210.000	1.320	778.000	12.400
16	320	0	0	80	240	0
17	120.000	840	152.000	520	226.000	1.700
18	334.000	19.000	122.000	1.140	742.000	15.200
19	222.000	2.467	96.000	800	544.000	1.620
20	362.000	12.200	222.000	4.440	280.000	10.200
21	400.000	1.500	216.000	1.420	296.000	1.660
22	356.000	1.820	132.000	1.720	294.000	2.040
23	136.000	2.840	68.000	2.627	100.000	2.320
24	33.000	640	8.800	200	24.400	360
25	54.000	6.400	44.000	3.600	16.000	2.000
MÉDIA	173.787	15.841	104.873	3.034	245.824	8.231

Legenda: Valores referentes a unidades formadoras de colônia (UFC/ml)
R2A (R2A Agar), PCA (Plate Count Agar), PD (Peptona Diluída) e
US (Ultrassom)

ANEXO B- Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) de fungos dos reservatórios de água da clínica de Dentística/Endodontia da FOB/USP no meio SDA antes e após o uso do ultrassom.

Reservatório (R)	SDA	SDA US
1	40	0
2	40	40
3	0	40
4	200	40
5	40	0
6	80	40
7	40	0
8	40	0
9	40	0
10	80	40
11	120	40
12	40	40
13	80	40
14	120	40
15	0	0
16	0	0
17	120	0
18	40	0
19	40	0
20	40	0
21	0	0
22	0	40
23	80	40
24	40	40
25	40	0
MÉDIA	52,4	19,2

Legenda: Valores referentes a unidades formadoras de colônia (UFC/ml)
SDA (Sabouraud Dextrose Agar) e US (Ultrassom)