

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

RACHEL MACIEL MONTEIRO

**Protocolo com produtos químicos para o enfrentamento do biofilme
em linhas d'água de equipos odontológicos: perspectiva física,
química, mecânica e biológica**

Ribeirão Preto
2021

RACHEL MACIEL MONTEIRO

Protocolo com produtos químicos para o enfrentamento do biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos: perspectiva física, química, mecânica e biológica

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Enfermagem Fundamental.

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

Orientador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

Ribeirão Preto
2021

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

Monteiro, Rachel Maciel

Protocolo com produtos químicos para o enfrentamento do biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos: perspectiva física, química, mecânica e biológica.

Ribeirão Preto,
2021.104 p.: il. ;
30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.
Orientador: Evandro Watanabe

1. Biofilme. 2. Desinfecção. 3. Controle de contaminação da água; 4. Produtos químicos; 5. Linha d'água de equipo odontológico.

MONTEIRO, Rachel Maciel

Protocolo com produtos químicos para o enfrentamento do biofilme em linhas d'água de equipamentos odontológicos: perspectiva física, química, mecânica e biológica

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa Enfermagem Fundamental.

Aprovado em//

Presidente da banca

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Zenaide Nicolino Maciel e Ademar Passini Monteiro**, que me deram a alegria de compartilhar a vida em uma família persistente e rica em valores. Sem vocês eu não seria nada. Obrigada pelo carinho, amor e respeito. Obrigada por sempre acreditarem em mim, até mesmo quando eu não acreditei. Sem medir esforços vocês sempre apoiaram os meus sonhos. Amo vocês!

Ao meu companheiro de vida, **Maciel Graziani Danna Bueno**, obrigada por cada incentivo, palavras e gestos de amor comigo. Obrigada por compartilhar mais esse sonho comigo. Te amo!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me guiar no caminho de luz e abençoando minhas escolhas.

Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe**, que sempre acreditou em mim, dando oportunidades únicas para serem vividas na área da pesquisa. Obrigada por casa incentivo.

À **Prof. Dra. Denise de Andrade**, pelos ensinamentos e acolhimento nesses anos todos no grupo de pesquisa: Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Gallo**, pela paciência comigo nessa nova área de conhecimento, serei sempre grata.

Ao **Programa de Pós-graduação em Enfermagem Fundamental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP**, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e o apoio recebido.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP**, aos professores e funcionários dos laboratórios de pesquisa por todo o suporte conferido a mim.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de doutorado.

À **Dra. Viviane de Cássia Oliveira**, por seu profissionalismo, auxílio em todas as fases dessa pesquisa e amizade.

Aos **membros do NEPECISS**, pelo convívio, mesmo que por alguns meses à distância, sempre se fizeram presentes quando eu precisava.

Aos meus amigos, **Felipe Lazarini Bim** e **Lucas Lazarini Bim**, obrigada por tornar essa trajetória mais leve com a amizade de vocês.

Aos meus irmãos, **Giuliana das Neves Monteiro Mourão**, **Luciana das Neves Monteiro** e **Alessandra das Neves Monteiro**, **Guilherme Maciel Sapia** e **Fernanda Maciel Sapia**, por dividirem a alegria e aflições da vida. Amo incondicionalmente cada um de vocês. A distância não nos separa!

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

Aos meus **familiares** que sempre se fizeram presentes.

À minha amiga de longa data, **Jacqueline Jordan Guedes**, que mesmo longe ainda dividimos nossas conquistas.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio (Bolsa de Doutorado) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

MONTEIRO, R. M. **Protocolo com produtos químicos para o enfrentamento do biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos:** perspectiva física, química, mecânica e biológica. 2021, 104 f. Tese (Doutorado – Enfermagem Fundamental) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A biossegurança na odontologia visa o enfrentamento da contaminação cruzada e o biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos. O objetivo deste estudo foi investigar, na perspectiva física, química, mecânica e biológica, um protocolo de uso de produtos químicos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos para melhoria e manutenção da qualidade da água. O protocolo com produtos químicos (Produto A – ácido cítrico + cloreto de sódio; Produto B – bicarbonato de sódio + cloreto de sódio; Produto AB – ácido cítrico + bicarbonato de sódio + cloreto de sódio) foi empregado em corpos de prova de aço inoxidável que, posteriormente, foram submetidos aos ensaios de microdureza e corrosão. Ainda, ensaios de cor, microdureza, rugosidade e de atividade antibiofilme [biomassa total (cristal violeta), atividade metabólica (XTT), viabilidade por meio de corante fluorescente e microscopia confocal de varredura à laser, bem como morfologia estrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)] foram realizados em corpos de prova de poliuretano. As cepas padrão empregadas para avaliar a atividade antibiofilme monoespécie foram *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Com relação à alteração da microdureza no aço inoxidável, após a imersão simulada por 1 e 2 anos nos Produtos (A+B+AB), não houve diferença dos resultados com o grupo controle (água). Decorrida a exposição aos produtos e grupo controle, a maioria das amostras de aço inoxidável apresentou tendência à corrosão. Ainda, houve alterações de cor, microdureza e rugosidade nas superfícies de poliuretano após a imersão simulada por 1 e 2 anos dos produtos e do grupo controle. A avaliação da biomassa dos biofilmes indicou que o Produto A ($p=0,003$) e o Produto AB ($p=0,019$) reduziram significativamente o biofilme de *P. aeruginosa* em comparação com o controle. Por outro lado, a avaliação da biomassa do biofilme formado por *S. aureus* sugeriu que o Produto B ($p=0,018$) promoveu maior ação antibiofilme. Em relação aos biofilmes formados por *E. coli*, o Produto A ($p=0,001$) e o uso sequencial dos Produtos A+B+AB ($p=0,021$) mostraram os melhores resultados. Para o XTT em comparação com o controle, os tratamentos com o Produto A ($p=0,001$), o Produto AB ($p<0,001$) e o uso sequencial dos Produtos A+B+AB ($p=0,002$) reduziram significativamente a atividade metabólica do biofilme de *P. aeruginosa*. No biofilme formado por *S. aureus*, contrariando os resultados observados na avaliação da biomassa, o Produto B não promoveu alterações significantes na atividade metabólica (Produto A: $p<0,001$; Produto AB: $p=0,007$; uso sequencial dos Produtos A+B+AB: $p<0,001$). Considerando o biofilme formado por *E. coli*, observou-se que o Produto B ($p=0,046$), o Produto AB ($p<0,001$) e o uso sequencial dos Produtos A+B+AB ($p<0,001$) promoveram redução da atividade metabólica. Observou-se redução significativa do biofilme total após o emprego dos produtos ($p<0,001$), em relação ao controle. Apesar da redução significativa, ainda se observou agregados de biofilme residual, cobrindo extensa porção das superfícies, mesmo após o uso dos produtos. Considerando a quantidade de células vivas de *P. aeruginosa* e *E. coli*, o Produto A e o Produto B, isolados ou em conjunto demonstraram resultados semelhantes. Além disso, o Produto AB e o uso

sequencial dos Produtos A+B+AB não promoveu diferença na quantidade de células vivas de *S. aureus*, em comparação ao controle, indicando que a combinação dos produtos não potencializou a atividade antibiofilme. Em conclusão, os produtos analisados nesta pesquisa mostraram potencial inovador para o enfrentamento do biofilme linha d'água dos equipos odontológicos, preservando as propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais.

Palavras-chave: Biofilme. Desinfecção. Controle de contaminação da água. Linha d'água de equipo odontológico. Produtos químicos.

ABSTRACT

MONTEIRO, R. M. **Protocol with chemical products to combat biofilm on dental unit waterlines: physical, chemical, mechanical, and microbiological perspective.** 2021, 104 f. Thesis (Doctoral – Fundamental Nursing) – School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Biosafety in dentistry aims to combat cross-contamination and biofilm on dental unit waterlines. The aim of this study was to investigate, from a physical, chemical, mechanical, and biological perspective, a protocol for the use of chemical products with possible applicability in dental unit waterlines to improve and maintain water quality. The protocol with chemicals (Product A – citric acid + sodium chloride; Product B – sodium bicarbonate + sodium chloride; Product AB – citric acid + sodium bicarbonate + sodium chloride) was used in stainless steel specimens which, later, were subjected to microhardness and corrosion tests. Moreover, color, microhardness, roughness and antibiofilm activity tests [total biomass (crystal violet), metabolic activity (XTT), viability by means of fluorescent dye and confocal laser scanning microscopy, as well as structural morphology of biofilm by scanning electron microscopy (SEM)] were performed on polyurethane specimens. The standard strains used to assess monospecies antibiofilm activity were *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). Regarding the microhardness change in stainless-steel, after simulated immersion for 1 and 2 years in Products (A+B+AB), there was no difference in the results with the control group (water). After exposure to the products and control group, most stainless-steel samples showed a tendency to corrosion. Furthermore, there were changes in color, microhardness, and roughness on the polyurethane surfaces after simulated immersion for 1 and 2 years of the products and the control group. Biofilm biomass evaluation indicated that Product A ($p=0.003$) and Product AB ($p=0.019$) significantly reduced *P. aeruginosa* biofilm compared to the control. On the other hand, the evaluation of the biomass of the biofilm formed by *S. aureus* suggested that Product B ($p=0.018$) promoted greater antibiofilm action. Regarding biofilms formed by *E. coli*, Product A ($p=0.001$) and the sequential use of Products A+B+AB ($p=0.021$) showed the best results. For XTT compared to the control, treatments with Product A ($p=0.001$), Product AB ($p<0.001$) and sequential use of Products A+B+AB ($p=0.002$) significantly reduced metabolic activity from the biofilm of *P. aeruginosa*. In the biofilm formed by *S. aureus*, contrary to the results observed in the biomass assessment, Product B did not promote significant changes in metabolic activity (Product A: $p<0.001$; Product AB: $p=0.007$; sequential use of Products A+B+ AB: $p<0.001$). Considering the biofilm formed by *E. coli*, it was observed that Product B ($p=0.046$), Product AB ($p<0.001$) and the sequential use of Products A+B+AB ($p<0.001$) promoted a metabolic activity reduction. There was a significant reduction in the total biofilm after using the products ($p<0.001$), compared to the control. Despite the significant reduction, residual biofilm aggregates were still observed, covering a large portion of the surfaces, even after using the products. Considering the amount of living cells of *P. aeruginosa* and *E. coli*, Product A and Product B, alone or together, showed similar results. In addition, Product AB and the sequential use of Products A+B+AB did not promote difference in the amount of living *S. aureus* cells, compared to the control, indicating that the combination of products did not enhance the antibiofilm activity. In conclusion, the products analyzed in this research showed innovative potential for facing the biofilm

on dental unit waterline, preserving the physical, chemical, and mechanical properties of the materials.

Keywords: Biofilm. Control of water contamination. Disinfection. Dental unit waterlines. Chemicals.

RESUMEN

MONTEIRO, R. M. **Protocolo con productos químicos para combatir el biofilm en líneas de agua de equipos dentales:** perspectiva física, química, mecánica y biológica. 2021, 104 h Tesis (Doctorado – Enfermería Fundamental) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

La bioseguridad en odontología tiene como objetivo combatir la contaminación cruzada y la biopelícula en las líneas de agua de los equipos dentales. El objetivo de este estudio fue investigar, desde una perspectiva física, química, mecánica y biológica, un protocolo de uso de productos químicos con posible aplicabilidad en las líneas de agua de los equipos dentales para mejorar y mantener la calidad del agua. El protocolo con productos químicos (Producto A – ácido cítrico + cloruro de sodio; Producto B – bicarbonato de sodio + cloruro de sodio; Producto AB – ácido cítrico + bicarbonato de sodio + cloruro de sodio) se utilizó en muestras de acero inoxidable que luego fueron sometidas a pruebas de microdureza y corrosión. Además, pruebas de color, microdureza, rugosidad y actividad antibiofilm [biomasa total (violeta cristal), actividad metabólica (XTT), viabilidad mediante colorante fluorescente y microscopía de barrido láser confocal, así como morfología estructural del biofilm por microscopía electrónica de barrido (SEM)] se realizaron en muestras de poliuretano. Las cepas estándar utilizadas para evaluar la actividad antibiofilm de las monoespecies fueron *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). En cuanto al cambio de microdureza en acero inoxidable, luego de la inmersión simulada durante 1 y 2 años en Productos (A+B+AB), no hubo diferencia en los resultados con el grupo control (agua). Después de la exposición a los productos y al grupo de control, la mayoría de las muestras de acero inoxidable mostraron una tendencia a la corrosión. Además, hubo cambios de color, microdureza y rugosidad en las superficies de poliuretano después de la inmersión simulada durante 1 y 2 años de los productos y el grupo de control. La evaluación de la biomasa del biofilm indicó que el Producto A ($p=0,003$) y el Producto AB ($p=0,019$) redujeron significativamente el biofilm de *P. aeruginosa* en comparación con el control. Por otro lado, la evaluación de la biomasa del biofilm formado por *S. aureus* sugirió que el Producto B ($p=0,018$) promovió una mayor acción antibiofilm. En cuanto a las biopelículas formadas por *E. coli*, el Producto A ($p=0,001$) y el uso secuencial de los Productos A+B+AB ($p=0,021$) mostraron los mejores resultados. Para XTT en comparación con el control, los tratamientos con Producto A ($p=0,001$), Producto AB ($p<0,001$) y el uso secuencial de Productos A+B+AB ($p=0,002$) redujeron significativamente la actividad metabólica de la biopelícula de *P. aeruginosa*. En la biopelícula formada por *S. aureus*, contrariamente a los resultados observados en la evaluación de biomasa, el Producto B no promovió cambios significativos en la actividad metabólica (Producto A: $p<0,001$; Producto AB: $p=0,007$; uso secuencial de Productos A+B+AB: $p<0,001$). Considerando el biofilm formado por *E. coli*, se observó que el Producto B ($p=0,046$), el Producto AB ($p<0,001$) y el uso secuencial de los Productos A+B+AB ($p<0,001$) promovieron una reducción de la actividad metabólica. Hubo una reducción significativa en la biopelícula total después del uso de los productos ($p<0,001$), en comparación con el control. A pesar de la reducción significativa, aún se observaron agregados residuales de biopelícula, cubriendo una gran parte de las superficies, incluso después de usar los productos. Considerando la cantidad de células vivas de *P. aeruginosa* y *E. coli*, el Producto A y el Producto B, solos o juntos, mostraron resultados similares. Además, el Producto AB y el uso

secuencial de los Productos A+B+AB no promovieron la diferencia en la cantidad de células vivas de *S. aureus*, en comparación con el control, lo que indica que la combinación de productos no mejoró la actividad antibiofilm. En conclusión, los productos analizados en esta investigación mostraron un potencial innovador para enfrentar la línea de flotación del biofilm de los equipos dentales, preservando las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los materiales.

Palabras clave: Biopelícula. Control de la contaminación del agua. Desinfección. Líneas de agua para equipos dentales. Productos químicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vista panorâmica dos corpos de prova de aço inoxidável e poliuretana.....	31
Figura 2	Fluxograma do protocolo de exposição dos corpos de prova aos produtos químicos.....	32
Figura 3	Fluxograma do protocolo de exposição dos corpos de prova aos produtos químicos.....	32
Figura 4	Vista panorâmica do microdurômetro da série HMV-2.....	33
Figura 5	Vista panorâmica do potenciostato / galvanostato modelo PGP201.....	34
Figura 6	Vista panorâmica do Microscópio eletrônico de Varredura e espectrômetro para microanálise elementar.....	35
Figura 7	Vista panorâmica do espectrocolorímetro portátil.....	36
Figura 8	Vista panorâmica do durômetro de <i>Shore A</i>	37
Figura 9	Vista panorâmica do microscópio confocal à laser.....	38
Figura 10	Fluxograma dos ensaios antibiofilme dos produtos químicos em corpos de prova de poliuretana de linhas d'água de equipos odontológicos.....	38
Figura 11	Valores de média e desvio padrão dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de dureza no aço inoxidável.....	43
Figura 12	Curvas da evolução do potencial de circuito aberto com o tempo.....	46
Figura 13	Curvas de polarização potenciodinâmica obtidas para todos os produtos e controle.....	46
Figura 14	Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável sem exposição.....	47
Figura 15	Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável sem exposição.....	47
Figura 16	Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição da água de abastecimento público.....	48

Figura 17	Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição de água de abastecimento público.....	48
Figura 18	Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição do produto A.....	49
Figura 19	Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição do produto A.....	49
Figura 20	Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição do produto B.....	50
Figura 21	Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição do produto B.....	50
Figura 22	Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição do produto AB.....	51
Figura 23	Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição do produto AB.....	51
Figura 24	Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra dos reagentes utilizados nos produtos.....	52
Figura 25	Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra dos reagentes utilizados nos produtos.....	52
Figura 26	Valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e o valor máximo dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de cor.....	54
Figura 27	Valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e o valor máximo dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de dureza na poliuretana.....	55
Figura 28	Valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e o valor máximo dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de rugosidade na poliuretana.....	56
Figura 29	Atividade antibiofilme de Produto A, Produto B, Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB na biomassa do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	58

Figura 30	Atividade antibiofilme de Produto A, Produto B, Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB na atividade metabólica do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> (A), <i>S. aureus</i> (B) e <i>E. coli</i> (C).....	61
Figura 31	Atividade antibiofilme do Produto A, Produto B, Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB em biofilme monoespécie formado por <i>P. aeruginosa</i> (A), <i>E. coli</i> (B) e <i>S. aureus</i> (C).....	64
Figura 32	Imagens fluorescentes representativas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> e após imersão em PBS - Controle, Produto A, Produto B, Produto AB e protocolo com os produtos A, B e AB.....	67
Figura 33	Fotomicrografias por MEV representativas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> e após imersão em PBS - Controle, Produto A, Produto B, Produto AB e protocolo com os produtos A, B e AB.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos produtos químicos empregados na pesquisa.....	31
Tabela 2	Avaliação da microdureza (<i>Vickers</i> - VHN) em corpos de prova de aço inoxidável após o emprego do protocolo de imersão por um período simulado de 1 e 2 anos.....	44
Tabela 3	Avaliação da alteração de cor (ΔE), microdureza (Shore A) e rugosidade de superfície (S_a) em espécimes de poliuretana após a aplicação dos protocolos de imersão por um período simulado de 1 e 2 anos.....	57
Tabela 4	Biomassa (absorbância 570 nm) de biofilme monoespécies formados por <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> após a aplicação dos protocolos de imersão.....	60
Tabela 5	Atividade metabólica (absorbância 492 nm) de biofilme monoespécies formados por <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> após a aplicação dos protocolos de imersão.....	62
Tabela 6	Atividade antibiofilme de diferentes produtos contra biofilme monoespécies formados por <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISTA DA LITERATURA	23
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
3.2.1 Na perspectiva física, química e mecânica.....	29
3.2.2 Na perspectiva biológica.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Local do estudo.....	30
4.2 Procedimentos éticos em pesquisa.....	31
4.3 Ensaios: propriedades físicas, químicas e mecânicas.....	31
4.3.1 Ensaios no aço inoxidável.....	33
4.3.1.1 Ensaio de microdureza.....	33
4.3.1.2 Ensaio de corrosão.....	34
4.3.1.3 Ensaios de composição química e estrutural da superfície.....	35
4.3.2 Ensaios na poliuretana.....	35
4.3.2.1 Ensaio de cor.....	35
4.3.2.2 Ensaio de dureza.....	36
4.3.2.3 Ensaio de rugosidade de superfície.....	37
4.4 Ensaios biológicos.....	38
4.4.1 Quantificação da biomassa total.....	39
4.4.2 Mensuração da atividade metabólica.....	40
4.4.3 Investigação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser.....	40
4.4.4 Análise da morfologia estrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
4.5 Análise dos dados.....	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Ensaios: propriedades físicas, químicas e mecânicas.....	43
5.1.1 Ensaios no aço inoxidável.....	43
5.1.1.1 Ensaio de dureza.....	43
5.1.1.2 Ensaio de corrosão.....	45

5.1.1.3 Ensaio de composição química e estrutural da superfície.....	47
5.1.2 Ensaio na poliuretana.....	53
5.1.2.1 Ensaio de cor.....	53
5.1.2.2 Ensaio de dureza.....	54
5.1.2.3 Ensaio de rugosidade de superfície.....	55
5.2 Ensaio biológicos.....	58
5.2.1 Quantificação da biomassa total.....	58
5.2.2 Mensuração da atividade metabólica.....	60
5.2.3 Investigação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser.....	63
5.2.4 Análise da morfologia estrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE.....	81

1 INTRODUÇÃO

A água na odontologia é primordial para diversos procedimentos relacionados ao tratamento odontológico, como a higienização das mãos, lavagem e esterilização de instrumental. Ao longo da história, a evolução do equipo odontológico exigiu que o equipamento giratório de alta velocidade apresentasse um resfriamento por água para que injúrias térmicas aos tecidos bucais e ao próprio equipamento não ocorressem. Esse problema foi contornado com a instalação de uma mangueira/tubulação longa, fina e flexível para canalização de água e ar para às seringas tríplices e os alta rotação (MILLS; KARPAY, 2002). Os profissionais não imaginavam que essas linhas d'água longas e delgadas poderiam albergar e proteger uma quantidade alarmante de microrganismos provenientes da água e outras fontes, mesmo com a instituição de princípios básicos de assepsia (WATANABE; MONTEIRO; SOUZA, 2021).

Os microrganismos apresentam crescimento favorável tanto nos reservatórios como nas linhas d'água de equipos odontológicos em decorrência da estagnação ou ausência de fluxo da água nesses locais durante longos períodos (BLAKE, 1963; KELSTRUP et al., 1977). Ademais, o *design* do sistema de distribuição de água é considerado um ambiente favorável para o crescimento do biofilme, pois as linhas d'água ou mangueiras longas e estreitas dos equipos odontológicos podem permanecer na maioria das vezes preenchidas com água (MILLS; KARPAY, 2002). Outro facilitador da contaminação microbiana é a falha das válvulas antirrefluxo dos equipos odontológicos, que pode ocasionar a contaminação do sistema de água dos equipos odontológicos por microbiota e fluidos orgânicos bucais provenientes de pacientes (GIACOMUZZI; ZOTTI; DITOMMASO, 2019). Essa contaminação tem sido atribuída ao fenômeno do refluxo, que consiste em uma pressão negativa criada na peça de mão, fazendo com que material biológico do paciente possa fluir de volta para o aparelho. Equipamentos mais recentes têm sido desenvolvidos com dispositivos antirrefluxo, cujos resultados têm mostrado uma redução dessa contaminação, sem, no entanto, eliminar completamente a presença de contaminantes no interior das turbinas (WATANABE; MONTEIRO; SOUZA, 2021).

Biofilme linha d'água é uma comunidade/consórcio/ cadeia alimentar de microrganismos aderidos na superfície sólida de linhas d'água ou mangueiras de equipos odontológicos (MONTEIRO et al., 2018; MONTEIRO, 2018). Os microrganismos permanecem embutidos e protegidos em matriz de substâncias poliméricas extracelulares (açúcares, proteínas e ácidos nucleicos), em ambiente que

contém líquidos, sendo altamente resistente aos agentes antimicrobianos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). É importante conhecê-lo, pois o biofilme linha d'água é a principal causa de “amplificação” e propagação da contaminação microbiana da água de equipos no ambiente odontológico (COLEMAN et al., 2009). Uma vez formado, o biofilme protege os organismos e serve como um reservatório que altera significativamente o número de microrganismos flutuantes livres na água que sai das mangueiras. Os microrganismos sobre as superfícies são continuamente libertados do biofilme na água que passa através do lúmen do tubo, de modo que o biofilme se torna o principal reservatório para contaminação continuada do sistema (WATANABE; MONTEIRO; SOUZA, 2021).

Na odontologia, a qualidade da água empregada deve seguir os padrões estabelecidos pelo Gabinete do Ministro/Ministério da Saúde, Portaria GM/MS nº. 888, de 4 de maio de 2021, que “Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. Em referência a qualidade microbiológica da água, a recomendação é que o parâmetro de ausência de *Escherichia coli* em 100mL de água deve ser atendido. Esse padrão de qualidade microbiológica da água está em concordância com a *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos da América. Além disso, acerca da água de equipos odontológicos, conforme a *American Dental Association* (ADA) – (1996) e as diretrizes dos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) – (1993), as recomendações são que a água não apresente contaminação por bactérias heterotróficas aeróbias totais acima de 200UFC/mL.

O uso de agentes químicos deve ser realizado mediante recomendação dos fabricantes dos equipos odontológicos, visto que substâncias e/ou produtos químicos podem acarretar oxidação das partes metálicas das seringas tríplice e peças de mão dos alta rotação, bem como dano nas linhas d'água dos equipos odontológicos. Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) tem concedido registros aos fabricantes de produtos químicos, com vistas à desinfecção de reservatórios e linhas d'água de equipos odontológicos. Entretanto, no Brasil, ainda não há produto comercial aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para essa finalidade. Na literatura científica são reportados protocolos para desinfecção de reservatórios e linhas d'água dos equipos odontológicos com diferentes substâncias

e/ou produtos químicos, objetivando o controle da formação do biofilme (ABDALLAH; KHALIL 2011; BANSAL et al., 2011; LIN et al., 2011; O'DONNELL et al., 2011; PUTTAIAH; SEIBERT; SPEARS, 2011; ROSSI-FEDELE et al., 2011; KRAMER et al., 2012; PAREEK et al., 2013; AGAHI et al., 2014; BARBOT et al., 2014; DALLOLIO et al., 2014; BOWEN et al., 2015; HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015; LAL et al., 2015; PETTI; POLIMENI; ALLEN, 2015; COSTA et al., 2016; DITOMMASO et al., 2016; LIZON et al., 2016; PATEL; DESAI; OWEN, 2016; PAWAR et al., 2016; FUJITA, MASHIMA, NAKAZAWA, 2017; SHAJAHAN et al., 2017; MONTEIRO et al., 2018; NOOPAN et al., 2019; BAUDET et al., 2020; TUVO et al. 2020; CHENG et al., 2021). No entanto, os problemas relacionados às partes metálicas e linhas d'água dos equipamentos odontológicos ao longo do tempo, ainda não são completamente conhecidos (WATANABE; MONTEIRO; SOUZA, 2021).

Desta forma, mesmo que medidas essenciais no manejo da água no ambiente sejam realizadas pelos profissionais da odontologia, o desenvolvimento e a aplicabilidade de protocolos efetivos com o emprego de produtos químicos inovadores de baixo custo ainda são escassos no Brasil, e justificam pesquisas, visando o enfrentamento da contaminação microbiana da água na odontologia e, por conseguinte, a manutenção do ambiente biologicamente seguro e a biossegurança dos profissionais e pacientes.

2 REVISTA DA LITERATURA

Esta revista da literatura foi desenvolvida a partir de uma busca sistematizada de artigos científicos originais relacionados a produtos químicos para o enfrentamento da problemática da presença do biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos e a contaminação microbiana da água. A busca dos artigos científicos foi realizada no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* como forma de atualização do conhecimento científico disponível na dissertação de mestrado intitulada: "Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica: uma proposta de intervenção" – (MONTEIRO, 2018).

Patel, Desai e Owen (2016) compararam a atividade antibiofilme *in vitro* de dois produtos empregados na desinfecção de linhas d'água de equipos odontológicos [percarbonato de sódio (PCS) e o dióxido de cloro (ClO_2)]. Fragmentos das linhas d'água dos equipos odontológicos foram cortadas, abertas e cultivadas com biofilmes em monocultura e mistos a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 2943), *Enterococcus faecalis* (ATCC29121) e *Streptococcus mutans* (cepa clínica). Ademais, biofilmes coletados de linhas d'água de equipos odontológicos foram expostos à água destilada esterilizada, bem como o PCS e o ClO_2 a 5 e 10 ppm em sistemas estático e em fluxo contínuo. Em seguida, a carga bacteriana foi determinada. Nos biofilmes em monocultura, PCS e ClO_2 a 5 e 10 ppm reduziram a carga bacteriana em comparação com o controle ($p < 0,01$). No entanto, não houve diferença significativa entre PCS e ClO_2 ($p > 0,05$). Nos biofilmes em cultura mista expostos aos desinfetantes em sistema estático, ClO_2 reduziu mais o biofilme ($p = 0,02$) em comparação com água e o PCS. Da mesma forma, em fluxo contínuo, o ClO_2 mostrou-se superior à água. Concluíram que o ClO_2 em concentrações reduzidas (sistemas estáticos e em fluxo contínuo) diminuiu o biofilme misto *in vitro* e, conseqüentemente, apresentou potencial para ser empregado durante o tratamento odontológico de pacientes, com vistas ao controle da formação do biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos.

De acordo com Lizzadro et al. (2019), o objetivo do estudo foi estabelecer a origem da contaminação microbiana proveniente das linhas d'água de equipos odontológicos e identificar os pontos críticos de contaminação relacionados ao ambiente odontológico. Um total de 14 equipos de cinco clínicas foi selecionado por apresentar um protocolo de segurança contra a contaminação da água. Para melhorar

as estratégias de segurança relacionadas à contaminação microbiana da água, procedimentos de manutenção e saneamento, bem como a contagem de bactérias aeróbias heterotróficas a 36 °C de duas bactérias, frequentemente, associadas aos biofilmes formados em linhas d'água de equipos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella* spp., foram avaliadas de dois diferentes tipos de suprimentos de água dos equipos odontológicos (tipo A: proveniente de um tanque de água, e tipo B: conectado diretamente à rede de abastecimento de água municipal). Os resultados evidenciaram que o tipo de abastecimento de água e as estratégias de segurança influenciaram diferentemente na contaminação bacteriana da água dos equipos odontológicos. As linhas d'água com suprimento do tipo A demonstraram maior contaminação bacteriana na água do que a do tipo B em todos os parâmetros microbiológicos analisados, com diferenças significativas na porcentagem de amostras positivas e carga bacteriana além dos limites de diretrizes padrão. Os resultados obtidos mostraram como o tanque de armazenamento, a ausência de válvulas antirrefluxo e os procedimentos de desinfecção realizados são os principais pontos críticos de contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos do tipo A, reforçando que a gestão dos equipos odontológicos (manutenção/higienização) muitas vezes é negligenciada ou não implementada corretamente pelas partes envolvidas, com a subestimação do risco real de infecção dos pacientes e profissionais da odontologia. Os resultados mostraram que a microbiota da água dos equipos odontológicos pode variar em relação ao tipo de água e, principalmente, aos procedimentos realizados, sinalizando para a importância do monitoramento da qualidade microbiológica da água, visando a sua potabilidade.

Noopan et al. (2019) investigaram a eficácia da esterilização por plasma na redução da contaminação bacteriana e no controle de biofilmes em linhas d'água de equipos odontológicos. Dez equipos odontológicos idênticos da Faculdade de Odontologia da Universidade de Chulalongkorn foram selecionadas para o estudo. Os equipos foram divididos em dois grupos, sendo um grupo controle (sem tratamento) e outro grupo experimental (com sistema de esterilização por plasma). Os equipos do grupo experimental foram equipados com um sistema de esterilização por plasma (DPS-110bi, Dentozone, Seul) que resultou em uma geração contínua de íons de plasma nas linhas d'água. As amostras de água foram coletadas da saída das linhas d'água dos alta rotação. Amostras de água foram coletadas no início (tempo zero) e

semanalmente durante 4 meses. As amostras de água foram semeadas em placas de Petri com ágar R2A e incubadas a 36 °C por 3 a 7 dias. Os números de unidades formadoras de colônia das bactérias foram contados e expressos por mililitro de água (UFC/mL). A identificação bacteriana foi efetuada por morfologias macroscópica (colônias) e microscópica (coloração de Gram). Outrossim, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para investigar o biofilme em fragmentos de linhas d'água dos equipos odontológicos. O metabolismo das células bacterianas do biofilme foi avaliado por meio do ensaio de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] – (MTT) com incubação a 37 °C por 3 h. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o teste *U* de *Mann-Whitney* e $p < 0,05$ considerado significativo. Evidenciou-se a contaminação alarmante das amostras de água das saídas das linhas d'água dos equipos odontológicos com médias de 4.800 a 30.440 UFC/mL. A esterilização por plasma reduziu efetivamente a contaminação bacteriana com médias de 212 para 8 UFC/mL. Durante todo o período de 4 meses, a carga bacteriana manteve-se aquém de 500 UFC/mL, padrão recomendado pelos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Ainda, a redução na contagem bacteriana foi significativa em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). Cabe ressaltar que a esterilização por plasma não erradicou os biofilmes existentes nas linhas de água, mas reduziu a biomassa e o metabolismo do biofilme. Além disso, o tratamento com esterilização por plasma não modificou os tipos bacterianos isolados na água. Em síntese, a esterilização por plasma com a água eletroquimicamente ativada reduziu eficientemente a formação de biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos, bem como a contaminação bacteriana da água.

Em 2020, Baudet et al. avaliaram a qualidade microbiológica da água de linhas d'água de equipos odontológicos submetidas a protocolo de desinfecção com *Biofilm-Removing-System*® (BRS®) e *Alpron*®/*Bilpron*® (*ALPRO*® *MEDICAL GmbH*, Alemanha) durante seis anos (junho de 2013 a junho de 2019) no hospital universitário regional de Nancy, França. Os 68 equipos selecionados do departamento foram desconectados do tanque central de abastecimento de água e receberam reservatórios (garrafas) individuais. As garrafas foram desinfetadas diariamente com auxílio de lavadora térmica. No início dos expedientes de trabalho (período da manhã) e entre o atendimento dos pacientes as linhas d'água dos equipos foram submetidas a *flush* por 30 a 45 s e 20 a 30 s, respectivamente. O protocolo de desinfecção das

linhas d'água dos equipos teve início com o *BRS*[®], depois, continuamente, com *Alpron*[®] e água esterilizada durante o expediente de trabalho, bem como *Bilpron*[®] nos períodos de inatividade do atendimento clínico. Semestralmente e durante seis anos a carga de bactérias aeróbias totais foram avaliadas a 22 °C e 36 °C por 44 h a 68 h, *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e coliformes totais. Das 628 amostras analisadas, 99,8 % apresentaram carga de bactérias aeróbias totais e não foram detectadas as bactérias, *Legionella* spp. e *P. aeruginosa*. Apenas uma amostra de água (0,2 %) não demonstrou conformidade com a carga de bactérias aeróbias totais a 36°C, com 140 unidades formadoras de colônias por mililitro de água. Em conclusão, com o intuito de controlar a contaminação da água dos equipos odontológicos, o protocolo implementado incluiu o tratamento de choque com *BRS*[®], desinfecção contínua e intermitente combinada com *Alpron*[®]/*Bilpron*[®], água esterilizada e desinfecção regular dos reservatórios, que foram eficazes no controle da contaminação bacteriana a longo prazo. Ainda, o monitoramento da qualidade microbiológica da água dos equipos odontológicos pode ser considerado útil não apenas para avaliar a eficácia das medidas preventivas, mas também como um guia para a escolha de estratégias corretivas.

Offner et al. (2020) elaboraram e avaliaram um protocolo de manutenção da qualidade microbiológica da água de um equipo odontológico móvel adaptado para uso durante anestesia geral pediátrica, por meio do gerenciamento das linhas d'água do equipo. Os produtos utilizados foram *Aniosyme X3*[®] por 5 min e *Calbenium*[®] a 2 % nos reservatórios acoplados aos equipos odontológicos móveis e submetidos a um *flush* por 1 min, manutenção nas linhas d'água por 5 min e, em seguida, enxágue do reservatório com água e *flush* por 30 s para retirada do produto nas linhas d'água. Amostras de água das saídas das linhas d'água do equipo odontológico móvel (seringa tríplice e alta rotação) foram coletadas nos tempos (zero), 1, 3, 6, 12 e 24 meses e cultivadas para a avaliação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de água (UFC/mL). Todos os resultados mostraram uma ausência de contaminação microbiana. O protocolo apresentado foi eficaz ao longo do tempo e permitiu garantir a segurança do uso do equipo odontológico móvel, mesmo durante procedimentos odontológicos sob anestesia, visto que as amostras coletadas antes e após o emprego do equipo em qualquer paciente demonstraram contaminação menor do que 1 UFC/mL para microrganismos aeróbios totais a 22 °C e a 37 °C, e sem a

presença de coliformes, *Escherichia coli* e/ou *Pseudomonas aeruginosa*. Concluiu-se a eficácia do protocolo ao longo do tempo e a possibilidade da implementação do equipo odontológico móvel em qualquer estrutura de atendimento odontológico que queira reforçar a biossegurança no que tange o controle de contaminação/infecção. Também, melhorou a qualidade no atendimento odontológico aos pacientes sob anestesia ao reduzir o tempo de espera.

Tuvo et al. (2020) investigaram durante 24 meses em uma Clínica Hospitalar de Odontostomatologia (CHO) e três Clínicas Odontológicas Privadas (COP) com 13 e seis equipos odontológicos, respectivamente. Todos os equipos odontológicos eram abastecidos por sistemas independentes, garrafas de polipropileno de 1 litro contendo água esterilizada, manualmente preenchidas. Durante a atividade odontológica, a água municipal era utilizada para o abastecimento dos equipos odontológicos e um interruptor era ativado, sinalizando a falta de água nos reservatórios. Em contraste, o equipo odontológico da sala de cirurgia foi completamente desconectado do abastecimento de água municipal. No hospital, a água potável foi descalcificada e tratada por meio de um processo de desinfecção secundária com dióxido de cloro de 0,2 a 0,3 mg / L, enquanto nas COP, a água foi apenas descalcificada. De acordo com as recomendações do fabricante, um desinfetante que produziu ácido peracético a 0,2 % foi utilizado nos equipos odontológicos. Apenas em uma COP, que apresentava dois equipos odontológicos, a desinfecção foi realizada manualmente, diariamente, por meio da aplicação de compostos quaternários de amônio a 2,5 %. No hospital, um protocolo foi desenvolvido e compartilhado com a equipe da clínica odontológica para o correto gerenciamento de cada equipo odontológico. De acordo com o procedimento, todos os equipos odontológicos foram submetidos ao *flush* de pelo menos dois minutos no início e no final do expediente de trabalho, bem como após qualquer período significativo de inatividade dos equipos. Além disso, o *flush* foi realizado por pelo menos 20 a 30 s entre o atendimento dos pacientes. Decorrida a primeira coleta, um protocolo de desinfecção de choque foi implementado nos equipos odontológicas. Nas COP, os equipos odontológicos foram submetidos à desinfecção com peróxido de hidrogênio a 3 % (v/v) por 1 h, seguida de *flush* com água. Já na CHO, o protocolo de desinfecção por choque foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3 e 6 % (v/v) seguido com peróxido de hidrogênio e surfactantes a 4 % (v/v) – (*Green Line Hydrogen Peroxide Cleaner* 4%). Durante a primeira coleta, as amostras da CHO

mostraram uma alta prevalência (31 %) de *Legionella* spp.. Nas COP, os sorogrupos 2 a 15 de *Legionella pneumophila* foram isolados em 33 % dos equipos odontológicos. Depois de 30 dias da implementação do protocolo de choque com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) em 12 equipos odontológicas da CHO, as contagens microbianas totais, após incubação a 22 °C e 37 °C, foram superiores aos valores recomendados pela legislação italiana (menores de 100 UFC/mL e 10 UFC/mL, respectivamente) em praticamente todas as amostras. Outrossim, houve a detecção de *Legionella* spp. em apenas um equipo odontológico (8 %), que foi eliminada após o protocolo de desinfecção de choque com peróxido de hidrogênio a 6 % (v/v). Em conclusão, o protocolo de desinfecção de choque com peróxido de hidrogênio e surfactantes a 4 % sinalizaram como alternativa promissora para redução da contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos por *Legionella* spp. e, a longo prazo, controle do biofilme.

Em 2021, Cheng et al. investigaram os efeitos bacteriostáticos dinâmicos de diferentes formulações desinfetantes com prata nanométrica (PNM) em biofilmes de linhas d'água de equipos odontológicos. As formulações de PNM de fase líquida e fase sólida nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 % foram avaliadas contra amostras de biofilme de equipos odontológicos, que foram coletadas e cultivadas. Efeitos bacteriostáticos dinâmicos de diferentes formulações de PNM foram observados nos 1º, 4º, 7º, 14º, 28º dias após a implementação das formulações de PNM. Ainda, os efeitos bacteriostáticos da PNM de fase líquida em biofilmes linha d'água de equipos odontológicos foram de 20 % no 1º dia. Entretanto, os efeitos bacteriostáticos da PNM de fase líquida em biofilmes reduziram por período prolongado a carga microbiana sem houve diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$). A PNM de fase sólida demonstrou elevada capacidade bacteriostática na diminuição da contaminação bacteriana. Como previsto, não houve detecção de bactérias no 1º, 4º, 7º, 14º, 28º dias após a implementação das formulações de PNM de fase sólida, inferindo uma atividade antibacteriana a longo prazo. Ademais, houve diferença significativa em termos de efeitos bacteriostáticos entre as formulações de PNM de fases sólida e líquida ($p < 0,001$). Os autores concluíram que a contaminação microbiana em linhas d'água de equipos odontológicos pode ser controlada com diferentes PNM, com destaque para a formulação de fase sólida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar, na perspectiva física, química, mecânica e biológica, um protocolo de uso de produtos químicos com possível aplicabilidade nas linhas d'água de equipamentos odontológicos para melhoria e manutenção da qualidade da água.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Na perspectiva física, química e mecânica

- ✓ Determinar a alteração da microdureza no aço inoxidável após a exposição simulada por 1 e 2 anos dos produtos;
- ✓ Explorar o processo de corrosão do aço inoxidável após a exposição dos produtos.
- ✓ Determinar a alteração de cor, microdureza e rugosidade de superfície da poliuretana após a exposição simulada por 1 e 2 anos dos produtos;

3.2.2 Na perspectiva biológica

- ✓ Quantificar a biomassa total, com violeta cristal, no biofilme monoespécie composto por *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, após a exposição dos produtos;
- ✓ Mensurar a atividade metabólica das células bacterianas, com a redução do sal de tetrazólio (XTT), no biofilme monoespécie composto por *P. aeruginosa*; *S. aureus* e *E. coli* após a exposição dos produtos;
- ✓ Investigar a viabilidade das células bacterianas, por meio de corante fluorescente e microscopia confocal de varredura à laser (*Operetta CLS High-Content*), no biofilme monoespécie composto por *P. aeruginosa*; *S. aureus* e *E. coli* após a exposição dos produtos;
- ✓ Analisar a morfologia estrutural do biofilme monoespécie composto por *P. aeruginosa*; *S. aureus* e *E. coli* após a exposição dos produtos com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa laboratorial / experimental que atende o objetivo geral preestabelecido de investigar, *in vitro*, a aplicabilidade de um protocolo de uso de produtos químicos nas linhas d'água de equipos odontológicos para melhoria e manutenção da qualidade da água de equipos odontológicos na perspectiva física, química, mecânica e biológica. A simulação de uso dos produtos químicos foi realizada considerando uma aplicação semanal do protocolo por 1 e 2 anos, no período em que uma clínica odontológica estaria sem atendimento presencial (finais de semana). Desse modo, para os ensaios mecânicos e químicos, as variáveis foram analisadas no início do ensaio (*baseline*) e após 1 e 2 anos de exposição ao protocolo, considerando que 1 ano apresenta 17 ciclos (cada ciclo composto de 3 semanas, sendo uma semana para o produto A – 1 min, outra para o produto B – 1 min e a última semana para o produto AB – 60 h); embasado no pedido de Patente junto à Agência USP de inovação com ID da Comunicação de Criação: CC-PI-2018-0057¹. Para a avaliação da atividade biológica, uma única exposição ao protocolo foi realizada.

4.1 Local do estudo

Os ensaios mecânicos e químicos das amostras da pesquisa foram realizados nos laboratórios de Metrologia do Departamento de Materiais Dentários e Próteses da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil; Laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes do Departamento de Materiais Dentários e Próteses da FORP-USP; Laboratório de Microscopia Confocal a Laser do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP; Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil; e Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Ortopedia e Anestesiologia da FMRP-USP.

O processamento e as análises microbiológicas da pesquisa foram executados no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da FORP-USP e no

¹ WATANABE, E.; RAZABONI, A. M. ; ANDRADE, D.; MONTEIRO, R. M.; OLIVEIRA, V. C. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR10201901285, título: "Composições antibiofilmes, método para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica da água e uso das composições antibiofilmes", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/06/2019.

laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP-USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

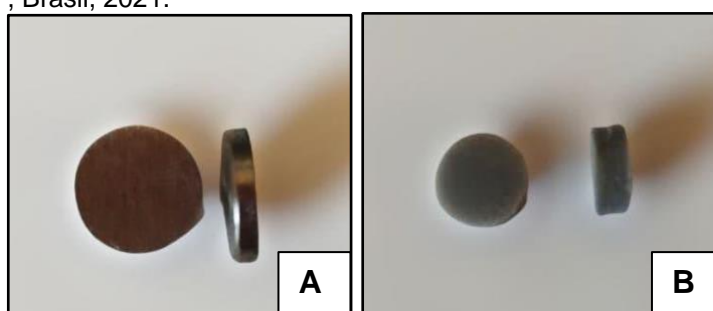
4.2 Procedimentos éticos em pesquisa

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

4.3 Ensaio: propriedades físicas, químicas e mecânicas

Para realização dos ensaios para avaliação das propriedades físicas, químicas e mecânicas, 89 corpos de prova de aço inoxidável 316 L ($\varnothing 9 \times 2$ mm; n=55) e de poliuretana ($\varnothing 5 \times 3$ mm; n=34) – (Figura 1) foram distribuídos de forma aleatória em grupos experimentais e submetidos ao protocolo de uso de produtos químicos (Produto A, Produto B e Produto AB) – (Tabela 1 e Figura 2), por meio de imersão, simulando 1 e 2 anos de contato dos produtos químicos com as superfícies de linhas d'água de equipamentos odontológicos e peças de mão de seringas tríplex e alta rotação.

Figura 1 – Vista panorâmica dos corpos de prova de **A)** aço inoxidável 316L e **B)** poliuretana. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



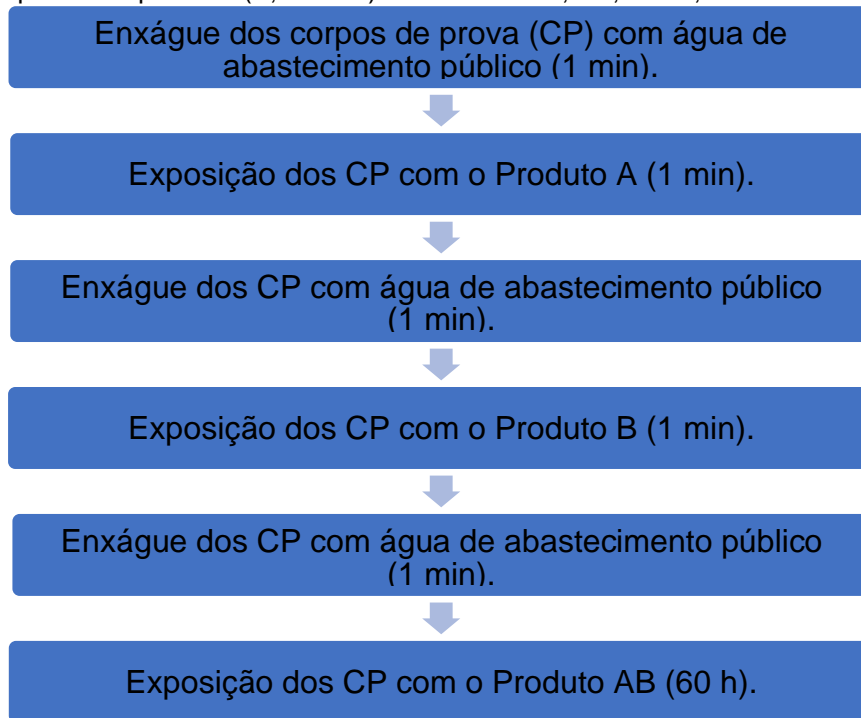
Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 1 – Composição dos produtos químicos empregados na pesquisa. *Dinâmica (Química Contemporânea Ltda, Indaiatuba, SP, Brasil). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Produtos	Composição
A	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ácido cítrico* ✓ cloreto de sódio*
B	<ul style="list-style-type: none"> ✓ bicarbonato de sódio* ✓ cloreto de sódio*
AB	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ácido cítrico* ✓ bicarbonato de sódio* ✓ cloreto de sódio*

Fonte: elaborada pela autora.

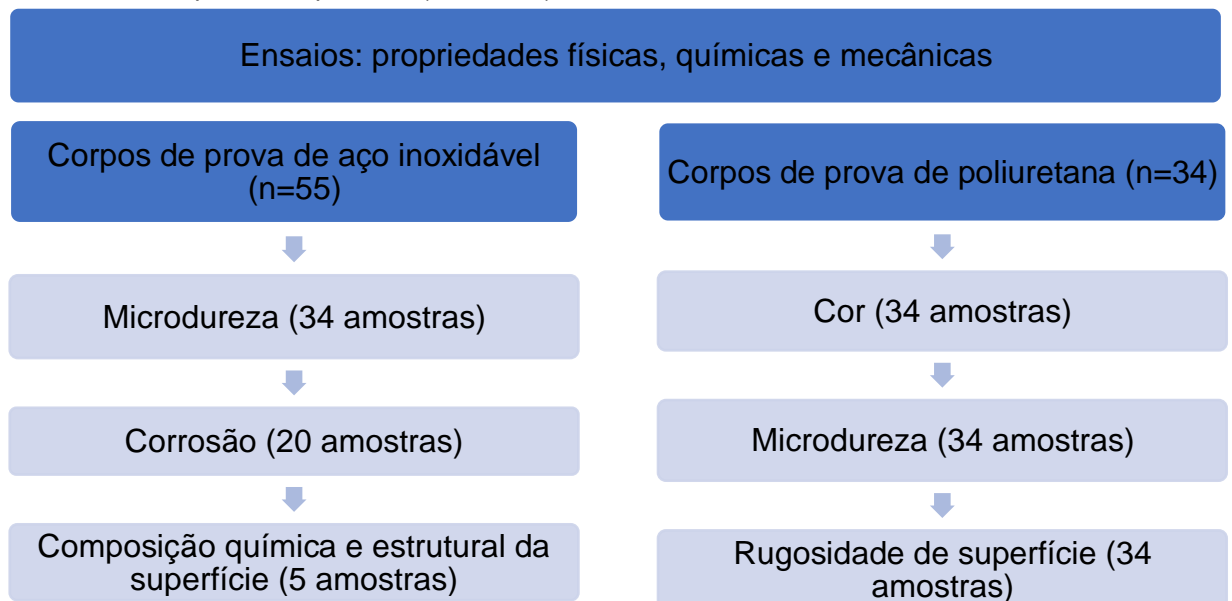
Figura 2 – Fluxograma do protocolo de exposição dos corpos de prova (aço inoxidável e poliuretana) aos produtos químicos (A, B e AB). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Os ensaios mecânicos e químicos nos corpos de prova de aço inoxidável foram os de microdureza, corrosão e composição química e estrutural da superfície. Por outro lado, para as amostras de poliuretana, os ensaios de propriedades físicas e mecânicas foram cor, microdureza e rugosidade de superfície (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma do protocolo de exposição dos corpos de prova (aço inoxidável e poliuretana) aos produtos químicos (A, B e AB). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



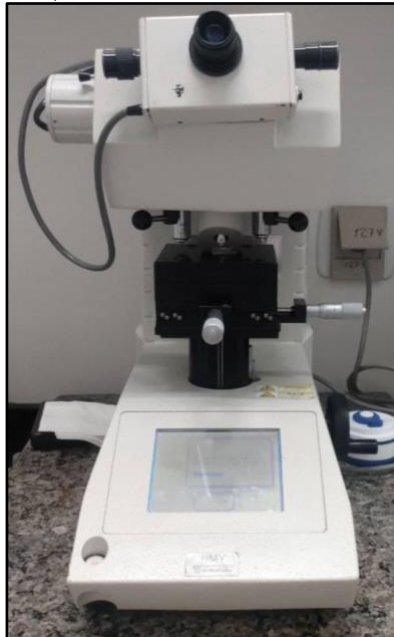
Fonte: elaborada pela autora.

4.3.1 Ensaio no aço inoxidável

4.3.1.1 Ensaio de microdureza

Para o ensaio de microdureza, corpos de prova (n=34) foram empregados para exposição à água de abastecimento público (grupo controle; n=14) e aos Produtos A, B e AB (n=20). Com auxílio de um microdurômetro da série HMV-2 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) – (Figura 4), uma moessa por quadrante (central, quadrante superior, e inferior direito e esquerdo) foi realizado, totalizando 5 moessas por corpo de prova, com penetrador de diamante *Vickers* piramidal de base quadrada com ângulo de 136° entre os planos. A carga aplicada foi de 19,614 N por 20 s. Os resultados foram fornecidos pelo próprio equipamento, após medição das diagonais das moessas produzidas para cada corpo de prova. O resultado da média aritmética das leituras foi utilizado como a microdureza *Vickers* (HV) para cada corpo de prova (FARIA, 2009).

Figura 4 – Vista panorâmica do microdurômetro da série HMV-2 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O equipamento está locado no laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes do Departamento de Materiais Dentários e Próteses da FORP-USP (Processo FAPESP nº 04/09320-9).

4.3.1.2 Ensaio de corrosão

Para o ensaio de corrosão, os Produtos A, B e AB e grupo controle (n=20) foram analisados separadamente. Cada grupo foi avaliado em quintuplicata (n=5). Os corpos de prova foram lixados (lixas de gramaturas 420, 600, 1020 e 2000) (Norton Indústria Brasileira, Guarulhos, SP, Brasil) e polidos com tecido para polimento metalográfico de 200 mm (Fortel Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) juntamente com solução de lubrificante azul (utilizado com pasta de diamante) – (Fortel Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e alumina em suspensão APF de 1,0 μ para o primeiro polimento e 0,05 μ no segundo polimento, com o auxílio da politriz horizontal (Fortel Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com intuito de reduzir as irregularidades das superfícies. Após o polimento, cada corpo de prova foi submetido ao processo de lavagem por 15 min com imersão em álcool isopropílico em lavadora ultrassônica. Em seguida, os corpos de prova foram mantidos em água purificada do tipo II durante 10 min em lavadora ultrassônica. Decorrido esse período, os corpos de prova foram secos por jato de ar quente para evitar qualquer ação da água residual sobre eles.

O ensaio de corrosão foi desenvolvido conforme descrito por Vasconcelos (2018), com auxílio de um potenciostato / galvanostato modelo PGP201 (Radiometer Copenhagen, Dinamarca), assistido pelo *software Voltmaster 1* (Figura 5). A análise de potencial de circuito aberto (OCP) teve um período de mensuração de 60 min, com leituras do potencial das amostras a cada 30 s. Após os 60 min, iniciou-se a polarização anódica com um potencial de 0 de -500 mV a 1 de 2000 mV, com leitura dos pontos a cada 120 mV/min.

Figura 5 – Vista panorâmica do potenciostato / galvanostato modelo PGP201 (Radiometer Copenhagen, Dinamarca). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O equipamento está locado no laboratório de Pesquisa em Metrologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP (Processo FAPESP nº 99/01618-9).

4.3.1.3 Ensaios de composição química e estrutural da superfície

As amostras foram submetidas à análise da composição química e estrutural e à avaliação das características microscópicas das superfícies por meio do microscópio eletrônica de varredura *Oxford Instruments X-Max* (JEOL – 6610LV) com contrastes topográfico e composicional, alto vácuo e baixo vácuo. Além disso, espectrômetro para microanálise elementar (EDS): espectros de energia e mapeamento composicional (Figura 6).

Figura 6 – Vista panorâmica do microscópio eletrônico de varredura e espectrômetro para microanálise elementar. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O equipamento está locado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da FMRP-USP.

4.3.2 Ensaios na poliuretana

4.3.2.1 Ensaio de cor

A mensuração de cor foi efetuada na parte interna dos corpos de prova de poliuretana de linha d'água de equipo odontológico, com auxílio do espectrocolorímetro portátil (Delta Color – delta vista 450G SN 7003000511) – (Figura 7) e obtidas no *software i7 gold NC*. Iluminação padronizada D650 foi empregada com ângulo de observação de 10° e fonte de luz com espectro visível (400 a 700nm). A

geometria de medição foi de 45/0. Os valores de ΔL^* , Δa^* e Δb^* , correspondendo à diferença dos valores de L^* , a^* , b^* , respectivamente, foram calculados automaticamente antes e após as imersões. A mudança total de cor (ΔE) foi calculada, por meio da seguinte fórmula: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]$. Iluminação padronizada D650 foi empregada com ângulo de observação de 10° e fonte de luz com espectro visível (400 a 700nm). A geometria de medição foi de 45/0. Os valores de ΔL^* , Δa^* e Δb^* , correspondendo à diferença dos valores de L^* , a^* , b^* , respectivamente, foram calculados automaticamente antes e após as imersões. A mudança total de cor (ΔE) foi calculada, por meio da seguinte fórmula: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (ARRUDA, 2015).

Figura 7 – Vista panorâmica do espectrocolorímetro portátil (Delta Color – delta vista 450G SN 7003000511). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

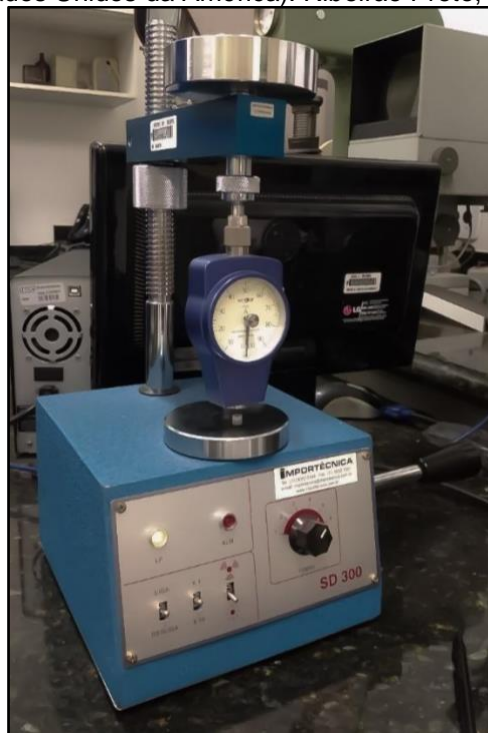
O equipamento está locado no Laboratório de Estudos Biomecânicos em Prótese e Implantes do Departamento de Materiais Dentários e Próteses da FORP-USP (Processo FAPESP nº 2017/15470-3).

4.3.2.2 Ensaio de microdureza

Para o ensaio de microdureza dos corpos de prova de poliuretano de linha d'água de equipo odontológico, as leituras foram realizadas na parte interna, por meio do durômetro *Shore A* (*Instrument and manufacturing Inc*, Frieport, Nova Iorque, Estados Unidos da América) – (Figura 8). Para a realização do ensaio, os corpos de

prova foram posicionados sob a haste vertical do durômetro a uma distância de aproximadamente 2,0 mm da ponta de penetração e submetidos a uma força constante de 1 kg (ASTM 2240,64). Um pesquisador, previamente, treinado e calibrado realizou cinco mensurações de microdureza em cada espécime para obtenção de um valor médio e os resultados foram fornecidos em unidades de *Shore A*. A microdureza foi mensurada antes e após a imersão das amostras nos produtos químicos (PINHEIRO, 2012).

Figura 8 – Vista panorâmica do durômetro de *Shore A* (*Instrument and manufacturing Inc*, Frieport, Nova Iorque, Estados Unidos da América). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

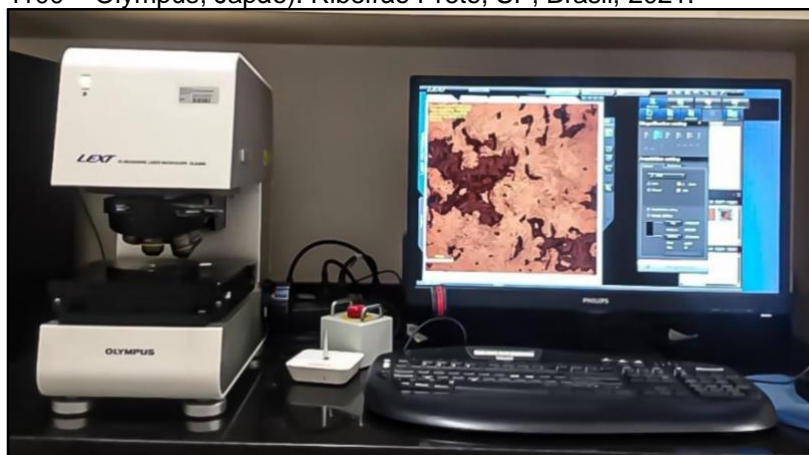
O equipamento está locado no laboratório de Pesquisa em Metrologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP (Processo FAPESP nº 04/09878-0).

4.3.2.3 Ensaio de rugosidade de superfície

O ensaio de rugosidade dos corpos de prova de poliuretano foi realizado com auxílio de microscópio confocal à laser (LEXT – *3d measuring laser microscope OLS 4100* – Olympus, Japão) – (Figura 9). Para o ensaio, os corpos de prova foram posicionados com a parte externa da linha d'água de equipo odontológico e a leitura efetuada no campo central da amostra e aumento de 10 x. A alteração da rugosidade

de superfície foi avaliada pelo cálculo da diferença de rugosidade dos corpos de prova antes e após a imersão das amostras nos produtos químicos.

Figura 9 – Vista panorâmica do microscópio confocal à laser (LEXT – 3d measuring laser microscope OLS 4100 – Olympus, Japão). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



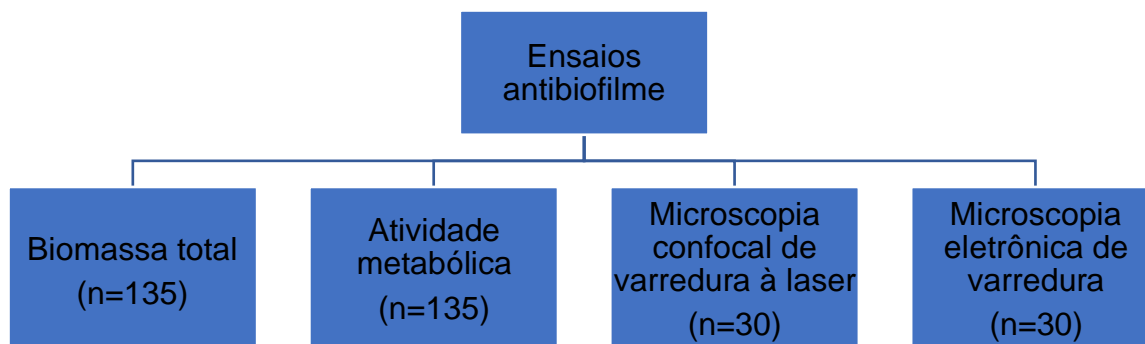
Fonte: elaborada pela autora.

O equipamento está locado no Laboratório de Microscopia Confocal a Laser do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP (FAPESP nº 2011/12901-7).

4.4 Ensaios biológicos

Os ensaios antibiofilme foram realizados conforme os princípios básicos de assepsia em Cabine de Segurança Biológica Classe II – modelo Bio Seg 12 (Grupo VECO, Campinas, SP, Brasil) – Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma dos ensaios antibiofilme dos produtos químicos (A, B e AB) em corpos de prova de poliuretano de linhas d'água de equipos odontológicos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

As cepas bacterianas padrão utilizadas nesta pesquisa foram:

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853);
- ✓ *Staphylococcus aureus* (ATCC 29923);
- ✓ *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.4.1 Quantificação da biomassa total

O biofilme monoespécie de cada cepa bacteriana foi formado em corpos de prova de poliuretada de linha d'água de equipo odontológico inseridos em microplacas de poliestireno (48 poços) - (KASVI Importação e Distribuição de Produtos para Laboratório Ltda, Curitiba, PR, Brasil). Em cada poço das microplacas foi adicionado 400 µL de *Mueller Hinton Broth* (MH) - (BD – Difco, Sparks, MD, Estados Unidos da América), inoculado com 10⁶ Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). A padronização do inóculo bacteriano foi realizada por meio da leitura de absorbância a 625 nm em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos da América) a partir de culturas planctônicas em fase de crescimento exponencial. A seguir, foi realizada incubação a 37 °C por 24 h com agitação orbital a 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil).

Decorrido o período de incubação, o meio de cultura foi descartado e os poços enxaguados com tampão fosfato-salino (PBS) por duas vezes para retirada das células planctônicas. Os três produtos químicos (A, B e AB) foram mantidos em contato com o biofilme formado de acordo com o seguinte protocolo: Produto A: 24 h; Produto B: 24 h; Produto AB: 24 h e Produto A+B+AB: 1 min Produto A + 1 min Produto B + Produto AB 24 h e duas lavagens com PBS foram realizadas, seguindo fixação com álcool etílico por 15 min. Depois da retirada do solvente e da secagem das microplacas a temperatura ambiente, realizou-se a adição de 400 µL de solução de cristal violeta durante 5 min. Os corpos de prova foram retirados das placas e três lavagens sequenciais foram realizadas com PBS. Os corpos de prova foram transferidos a uma nova placa de 48 poços e 400 µL de ácido acético a 33 % (v/v) foram adicionados a cada poço. A quantificação indireta da biomassa total dos biofilmes foi determinada a partir da medida da absorbância a 570nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Alemanha) - (HENRIQUES et al., 2005, 2006) das soluções de ácido acético por meio. O ensaio foi realizado em triplicata em três momentos distintos.

4.4.2 Mensuração da atividade metabólica

Para avaliação da atividade metabólica dos biofilmes monoespécies, as etapas de padronização do inóculo bacteriano, formação do biofilme e aplicação dos produtos descritas no item 4.4.1 foram empregadas. A atividade metabólica dos biofilmes, após a aplicação dos produtos (A, B e AB), foi avaliada através da redução do sal de tetrazólio (XTT) segundo metodologia descrita por Paranhos et al. (2019). Os corpos de prova de poliuretana de linha d'água de equipos odontológicos foram removidos das placas, enxaguados duas vezes em tampão PBS e submetidos aos produtos. Após dois subsequentes enxagues para remoção de resíduos dos produtos, os corpos de prova foram colocados em placas de 48 poços contendo 316 µL de PBS suplementado com 100 mM de glicose (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos da América), 80 µL de XTT a 1 mg/mL (Sigma Aldrich) e 4 µL de menadiona a 0,4 mM (Sigma Aldrich). As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 h. A absorbância da solução resultante foi avaliada a 492 nm em espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em triplicata em três momentos distintos.

4.4.3 Investigação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser

Duzentos microlitros de meio de cultura MH contendo suspensão bacteriana padronizada (10^6 UFC/mL) foram cultivados em placas pretas de 96 poços com fundo de vidro (Corning, New York, NY, Estados Unidos da América). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h em estufa com agitação orbital a 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil). Decorrido o período de 24 h de cultivo, o meio de cultura foi substituído por meio recém preparado. Após o período de incubação, o meio de cultura foi descartado e os poços foram enxaguados duas vezes com PBS para retirada das células planctônicas. Os produtos (A, B e AB) foram mantidos em contato com o biofilme de acordo com o protocolo descrito previamente (biomassa total). Após remoção dos produtos, os poços foram lavados por duas vezes com PBS e o biofilme remanescente foi corado com 100µL da solução *FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, Estados Unidos da América) por 15 min de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as placas foram digitalizadas e 15 imagens randomicamente distribuídas foram adquiridas com um microscópio *Operetta CLS High-Content* (PerkinElmer, Waltham, MA, Estados Unidos da América) para cada poço. Todas as imagens foram adquiridas em ampliação de

40 × usando os mesmos parâmetros de contraste e brilho. Para avaliar da viabilidade celular, a intensidade de fluorescência das imagens coradas em verde (Syto 9) e vermelho (Iodeto de propídio) foi analisada usando o software *Harmony High Content Imaging and Analysis* (PerkinElmer) segundo protocolo descrito por Oliveira et al. (2021). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.4 Análise da morfologia estrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de linha d'água submetidas à formação de biofilme e à ação dos produtos químicos (A, B e AB) conforme protocolo descrito previamente (biomassa total) foram transferidas para placas de 12 poços (Kasvi) contendo 3 mL de glutaraldeído a 2,5 % (v/v) (Sigma Aldrich) em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH = 7,4, para fixação do material biológico (biofilme). Decorrido o período de fixação, por no mínimo 12 h, as amostras foram desidratadas em série de álcoois a 15, 30, 50, 70, 95 e 100 % (v/v), durante 15 min para cada concentração. Uma vez desidratadas, as amostras foram mantidas em dessecador a vácuo, a fim de se evitar a incorporação de água.

Em seguida, procedeu-se à montagem das amostras em suportes metálicos (*stubs*) e prosseguiu-se metalização com ouro (20 KV, 15 mAp, 2 min) 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 Bioengenharia do Departamento de Ortopedia e Anestesiologia da FMRP-USP. As amostras foram submetidas à análise por meio do microscópio eletrônica de varredura *Zeiss EVO 50* com contrastes topográfico e composicional, alto vácuo e baixo vácuo.

4.5 Análise dos dados

Todas as variáveis referentes à absorbância (biomassa e atividade metabólica), área recoberta por biofilme (pixels), alteração de cor (ΔE), microdureza (*Shore A* e *Vickers*), rugosidade de superfície (*Sa*) e corrosão foram categorizadas como quantitativas contínuas. Outrossim, as seguintes variáveis e fatores de variação foram consideradas:

- ✓ Efeito dos diferentes protocolos sobre a biomassa do biofilme, com um fator de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB);

- ✓ Efeito dos diferentes protocolos sobre a atividade metabólica do biofilme, com um fator de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB);
- ✓ Efeito antibiofilme dos diferentes protocolos, com um fator de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB);
- ✓ Efeito dos diferentes protocolos na estabilidade de cor da poliuretana, com dois fatores de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB) e tempo (1 ano e 2 anos);
- ✓ Efeito dos diferentes protocolos sobre a microdureza da poliuretana, com dois fatores de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB) e tempo (*baseline*, 1 ano e 2 anos);
- ✓ Efeito dos diferentes protocolos na rugosidade de superfície da poliuretana, com dois fatores de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB) e tempo (*baseline*, 1 ano e dois anos);
- ✓ Efeito dos diferentes protocolos sobre a microdureza do aço inox, com dois fatores de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB) e tempo (*baseline*, 1 ano e 2 anos);
- ✓ Capacidade de corrosão da superfície do aço inox, com um fator de variação: produtos (Controle e Produtos A, B, AB).

Os dados foram avaliados quanto à adesão ou não à curva normal, pelo teste de *Shapiro–Wilk*, bem como a homogeneidade de variâncias pelo teste de *Levene* (*IBM SPSS Statistics 21.0*; *IBM Corp Armonk, NY, Estados Unidos da América*). Os dados referentes à biomassa, atividade metabólica, área recoberta por biofilme e corrosão apresentaram distribuição não normal e foram analisadas pelo teste de *Kruskal–Wallis* seguido do teste de *Dunn* (*IBM SPSS Statistics 21.0*). A variação de cor e rugosidade de superfície da poliuretana também apresentaram distribuição não normal sendo aplicada uma análise não paramétrica para dados longitudinais em experimento fatorial (nparLD) de *Brunner-Langner* (Noguchi et al., 2012) no pacote estatístico *R version 3.6.2* (*The R foundation for statistical computing*). As variáveis microdureza da poliuretana e microdureza do aço inox apresentaram distribuição normal e variância homogênea, e foram, portanto, analisadas por meio de ANOVA dois fatores seguido do teste de *Tukey* (*IBM SPSS Statistics 21.0*). Todas as múltiplas comparações foram realizadas com ajuste de *Bonferroni*. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio: propriedades físicas, químicas e mecânicas

5.1.1 Ensaio no aço inoxidável

5.1.1.1 Ensaio de microdureza

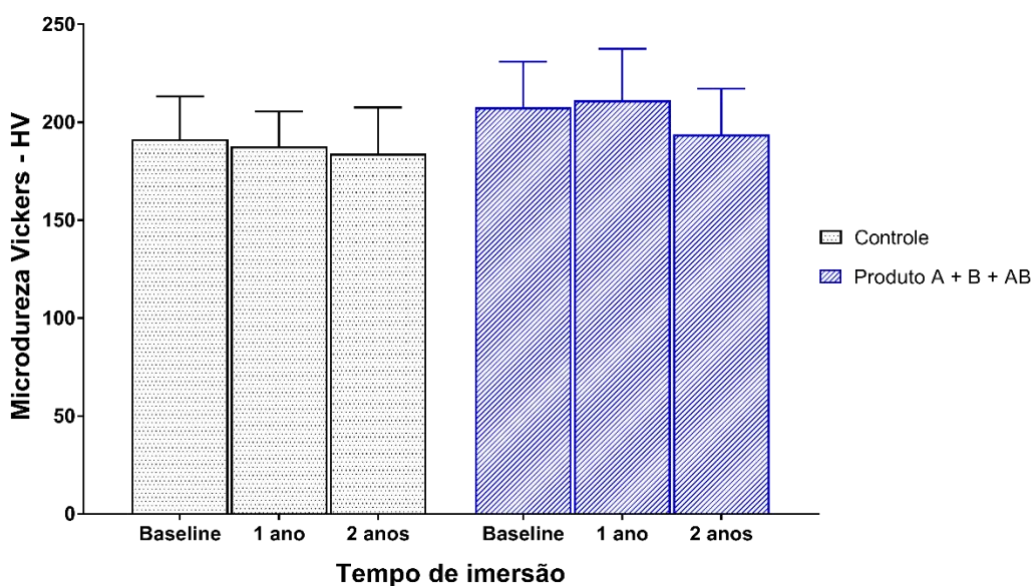
No ensaio da microdureza nos corpos de prova de aço inoxidável, após a imersão simulada por 1 e 2 anos em água, bem como com o emprego do protocolo com os produtos (A, B e AB), as variáveis tempo e produto tiveram efeito estatisticamente significativo. No entanto, a interação entre as variáveis (tempo e produto) não promoveu alteração estatisticamente significativa.

Independente do tempo, a imersão das amostras segundo o protocolo dos produtos (A, B e AB) – (média: 209,43) demonstrou maiores valores de microdureza (Vickers – HV) do que a água (média: 189,50) – $p < 0,013$.

Ao avaliar o tempo, independente do produto, houve uma redução da microdureza, após 2 anos de imersão, em relação aos valores iniciais (média do *baseline*: 200,90; média de 2 anos: 189,77; $p < 0,003$), porém com valores semelhantes à avaliação de 1 ano (1 ano x 2 anos – $p = 0,053$).

Os resultados das comparações estatísticas e as medidas de tendência central estão demonstrados na Tabela 2. Os valores de média e desvio padrão de cada grupo e tempo são representados na Figura 11 (Apêndice A, B e C).

Figura 11 – Valores de média e desvio padrão dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de microdureza no aço inoxidável. Ribeirão preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 2 – Avaliação da microdureza (*Vickers* - HV) em corpos de prova de aço inoxidável após o emprego do protocolo de imersão por um período simulado de 1 e 2 anos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Tempo de imersão	Produtos (A, B e AB)		Controle		Total produto	
	Média ± DP (Mediana)	IC (Máximo – Mínimo)	Média ± DP (Mediana)	IC (Máximo – Mínimo)	Média ± DP (Mediana)	IC (Máximo – Mínimo)
Baseline	207,62 ± 23,32 (207,20)	196,70; 218,54 (165,00 - 252,00)	191,31 ± 21,99 (189,80)	178,61; 204,00 (154,60 - 240,40)	200,90 ± 23,88 (202,90) ^A	192,57; 209,23 (154,60 - 252,00)
1 ano	211,24 ± 26,30 (210,50)	198,93; 223,55 (161,80 - 258,40)	187,69 ± 17,83 (179,90)	177,39; 197,98 (167,40 - 223,00)	201,54 ± 25,73 (202,20) ^{AB}	192,56; 210,52 (161,80 - 258,40)
2 anos	193,80 ± 23,31 (190,20)	182,89; 204,71 (156,80 - 235,20)	184,01 ± 23,58 (179,30)	170,40; 197,63 (151,40 - 222,00)	189,77 ± 23,57 (188,00) ^B	181,54; 198,00 (151,40 - 235,20)
Total tempo	209,43 ± 24,60 (208,20) ^a	201,56; 217,30 (161,80 - 258,40)	189,50 ± 19,73 (186,10) ^b	181,85; 197,15 (154,60 - 240,40)		

DP: Desvio Padrão. IC: Intervalo de confiança. ANOVA com ajuste de *Bonferroni* para dois fatores independentes (tempo e produtos). ^{AB} letras maiúsculas indicam comparações entre tempos. ^{ab} letras minúsculas indicam comparações entre produtos. Letras iguais indicam semelhança estatística.

5.1.1.2 Ensaio de corrosão

O potencial de circuito aberto (OCP) permite o desenho de comparação dos produtos no eletrólito em consideração, sendo uma medida da tendência à corrosão. Valores mais baixos de OCP representam uma tendência maior à corrosão.

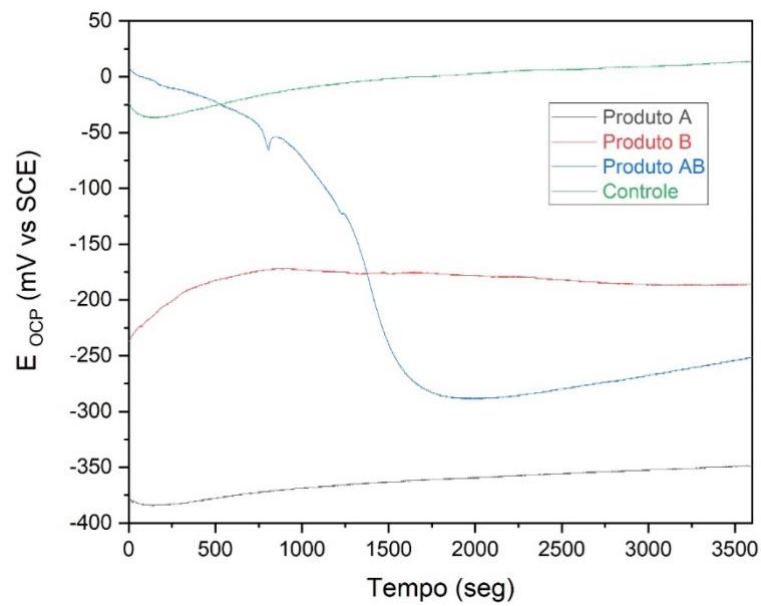
Para avaliação da corrosão, as seguintes variáveis foram consideradas: OCP e polarização anódica [potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente (i_{corr})]. Observou-se diferença entre os grupos para OCP ($p=0,003$) e i_{corr} ($p=0,003$). O potencial de corrosão foi estatisticamente semelhante entre os grupos ($p=0,289$). Na comparação entre os grupos, o Produto A apresentou baixo potencial em circuito aberto, em relação ao controle ($p=0,001$), indicando uma maior tendência a corrosão (Figura 12).

Em relação à densidade de corrente, menores valores foram observados para o Produto A ($p=0,002$) em relação ao controle, indicando que o aço tem bom comportamento. Contudo, as amostras dos Produtos B e AB apresentaram similaridade nos resultados, sendo também melhores quando comparados com o controle.

Para a maioria das amostras de aço inoxidável, uma ligeira diminuição do potencial foi observada durante o início da imersão na solução, indicando que a tendência à corrosão dos materiais aumentou devido ao contato com a solução (Produto A, Produto AB e controle) – (Figura 13).

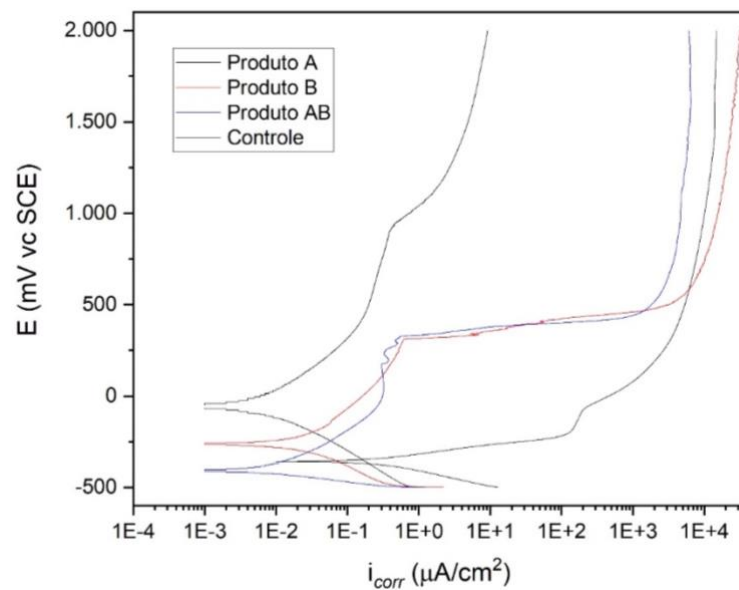
O aumento no potencial eletroquímico durante a imersão geralmente pode ser atribuído ao espessamento do filme passivo, que se torna mais protetor. No entanto, após 30 min de imersão, todos os produtos tenderam a atingir um estado estacionário. A rota de processamento não teve influência significativa nos valores de OCP obtidos após 1 h de imersão. Mesmo entre os diferentes produtos não houve diferenças significativas no potencial eletroquímico, que estava na faixa de ca. -220 a -330 mV vs. SCE (Apêndice D).

Figura 12 – Curvas da evolução do potencial de circuito aberto com o tempo. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 13 – Curvas de polarização potenciodinâmica obtidas para todos os produtos e controle. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

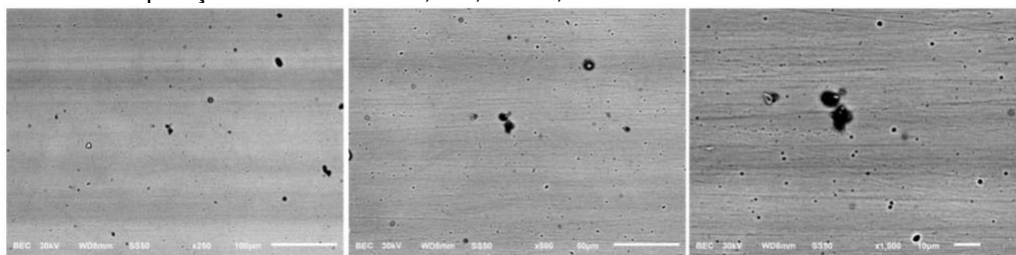


Fonte: elaborada pela autora.

5.1.1.3 Ensaios de composição química e estrutural da superfície

Fotomicrografias (250x; 500x e 1000x) obtidas da superfície do aço inoxidável por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra controle negativo (sem exposição) mostra que não há resíduo (Figura 14).

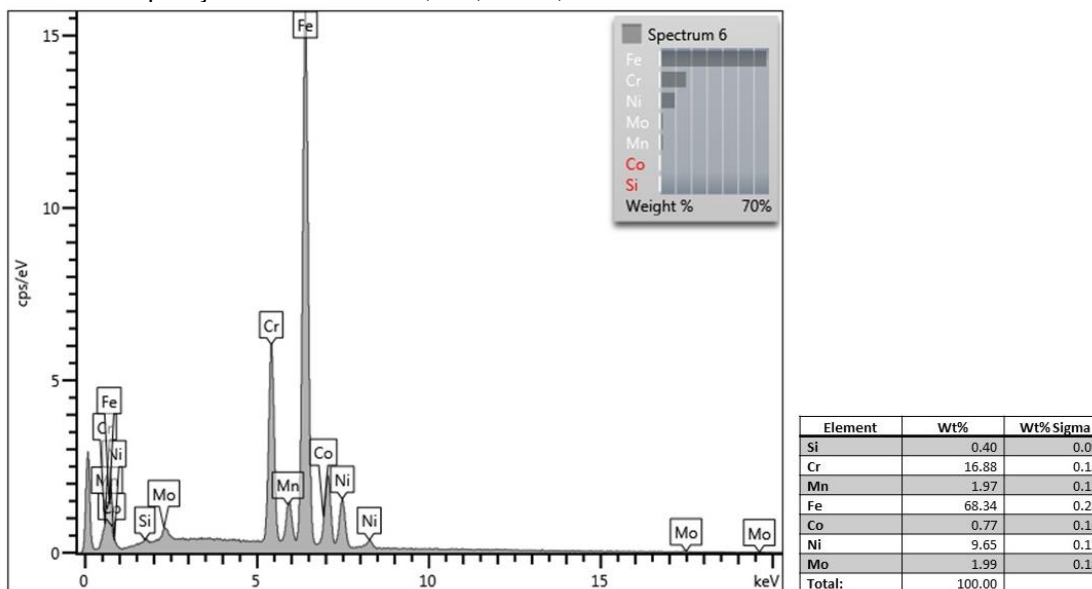
Figura 14 – Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável sem exposição. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O resultado para a espectrometria de microanálise elementar (EDS) para o corpo de prova de aço inoxidável sem nenhum tipo de exposição apresentou silício (0,40%); cromo (16,88%); manganês (1,97%); ferro (68,34%); cobalto (0,77%); níquel (9,65%); molibdênio (1,99%) – (Figura 15).

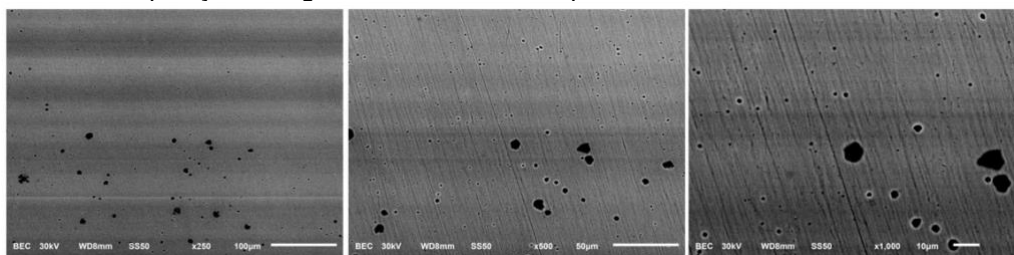
Figura 15 – Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável sem exposição. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Fotomicrografias (250x; 500x e 1000x) obtidas por microscopia das superfícies por meio da MEV mostrou que nas amostras em aço inoxidável com exposição em água de abastecimento público (controle positivo) não apresentou nenhum resíduo de cristais (Figura 16).

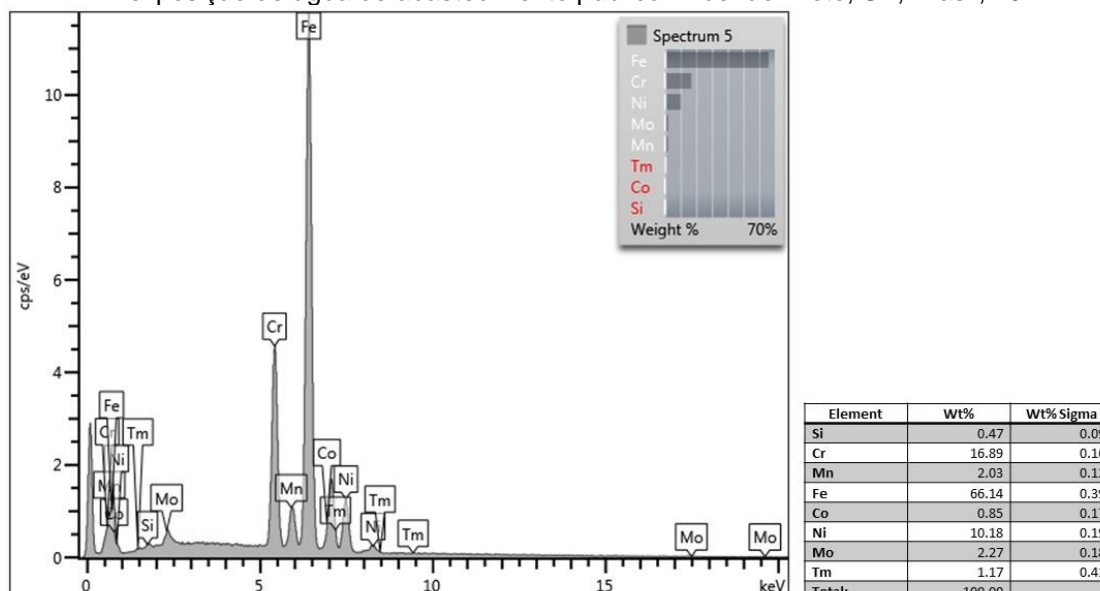
Figura 16 – Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição da água de abastecimento público. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O resultado para a EDS para o corpo de prova de aço inoxidável de exposição em água de abastecimento público apresentou silício (0,47%); cromo (16,89%); manganês (2,03%); ferro (66,14%); cobalto (0,85%); níquel (10,18%); molibdênio (2,27%) e túlio (1,17%) – (Figura 17).

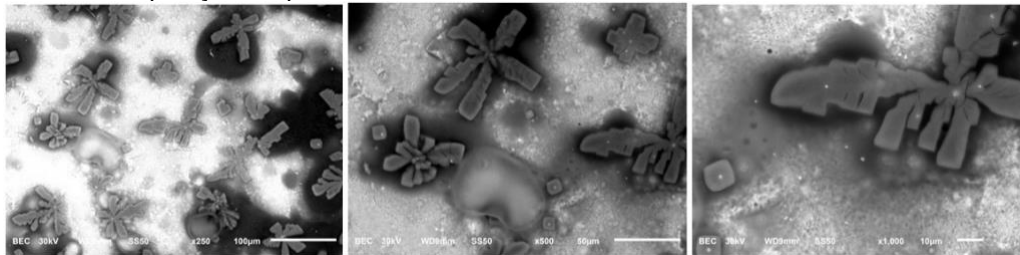
Figura 17 – Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição de água de abastecimento público. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Na amostra do aço inoxidável que esteve em exposição com o Produto A durante o processo de corrosão eletrolítica apresentou resíduos de cristais na sua superfície (Figura 18).

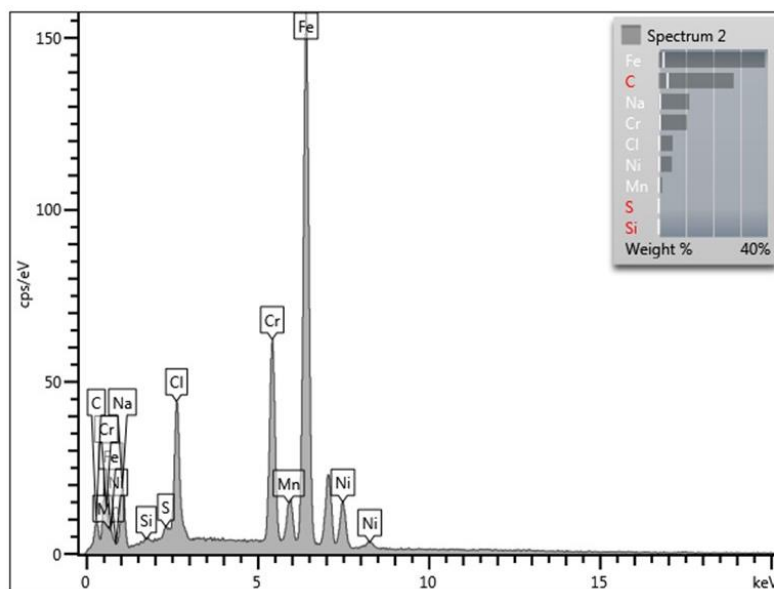
Figura 18 – Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição do produto A. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O resultado para a EDS apresentou carbono (27,49%); sódio (11,23%); silício (0,19%); enxofre (0,43%); cloro (5,11%); cromo (10,44%); manganês (1,32%); ferro (38,91%) e níquel (4,87%) - (Figura 19).

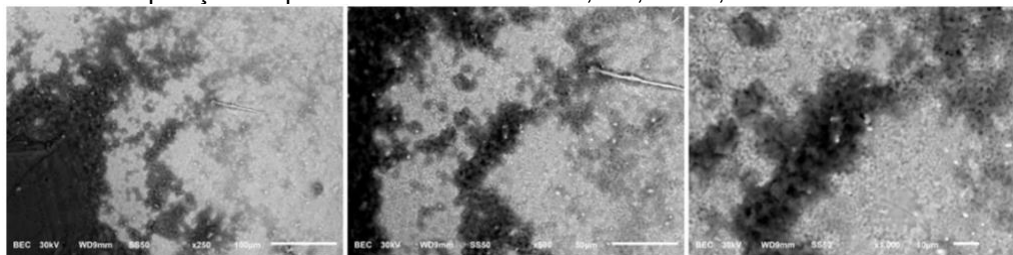
Figura 19 – Espectrometria de microanálise elemental (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição do produto A. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Na amostra do aço inoxidável que esteve em exposição com o Produto B durante o processo de corrosão eletrolítica apresentou resíduos de cristais na sua superfície (Figura 20).

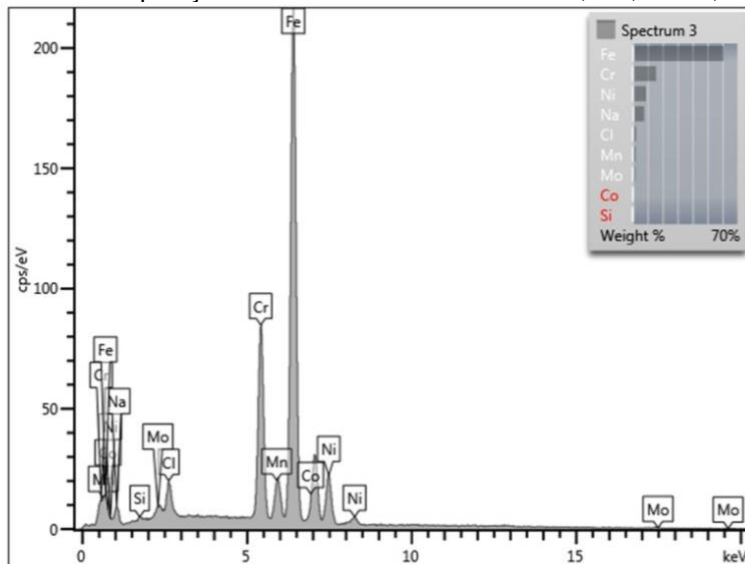
Figura 20 – Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição do produto B. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O resultado para a EDS apresentou de sódio (7,67%); silício (0,34%); cloro (2,35%); manganês (1,98%); ferro (60,86%); cobalto (0,61%); níquel (8,81%) e molibdênio (1,75%) – (Figura 21).

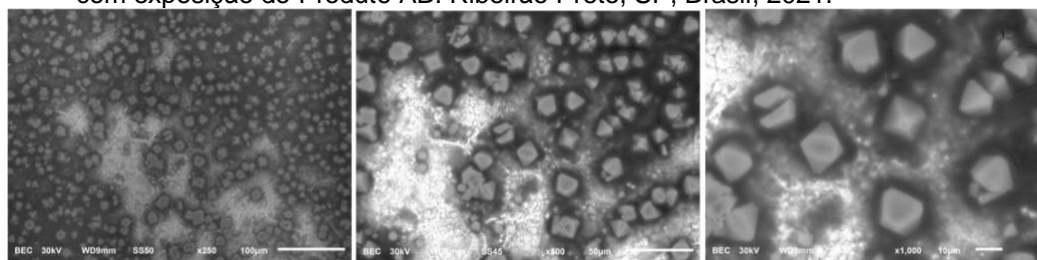
Figura 21 – Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição do Produto B. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Na amostra do aço inoxidável que esteve em exposição com o Produto AB durante o processo de corrosão eletrolítica apresentou resíduos de cristais na sua superfície (Figura 22). Nota-se que o acúmulo de cristais ocorreu nas áreas mais escuras do aço inoxidável.

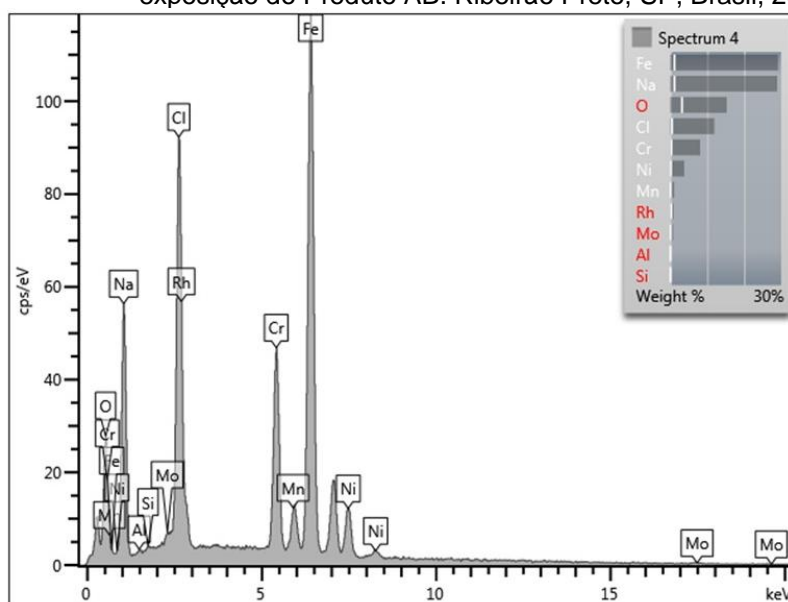
Figura 22 – Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra em aço inoxidável com exposição do Produto AB. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

O resultado para a EDS apresentou oxigênio (15,25%); sódio (28,89%); alumínio (0,23%); silício (0,18%); cloro (11,91%); cromo (8,09%); manganês (1,02%); ferro (29,13%); níquel (3,78%); molibdênio (0,71%) e ródio (0,81%) – (Figura 23).

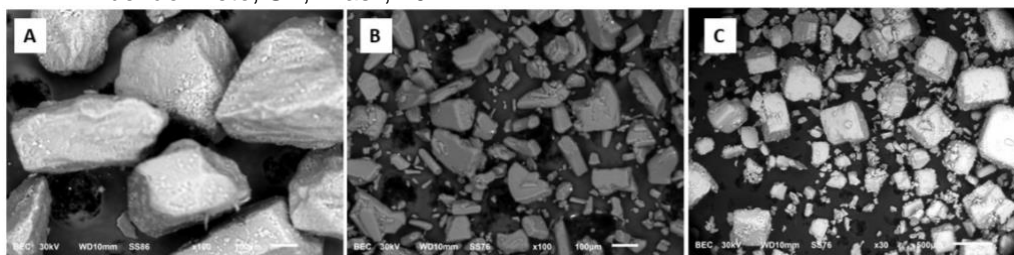
Figura 23 – Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra de aço inoxidável com exposição do Produto AB. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Ainda, foram realizadas fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura em aumento de 100x para avaliação dos produtos químicos ácido cítrico e bicarbonato, e 30x para avaliação do produto químico cloreto de sódio, os quais compõem os produtos avaliados nesse estudo (Figura 24).

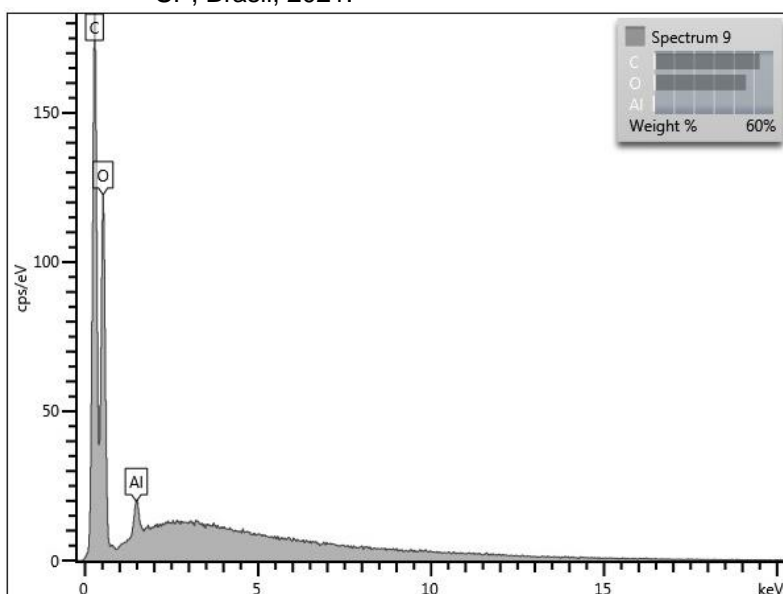
Figura 24 – Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura da amostra dos reagentes utilizados nos produtos. **A)** ácido cítrico; **B)** bicarbonato de sódio e **C)** cloreto de sódio. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

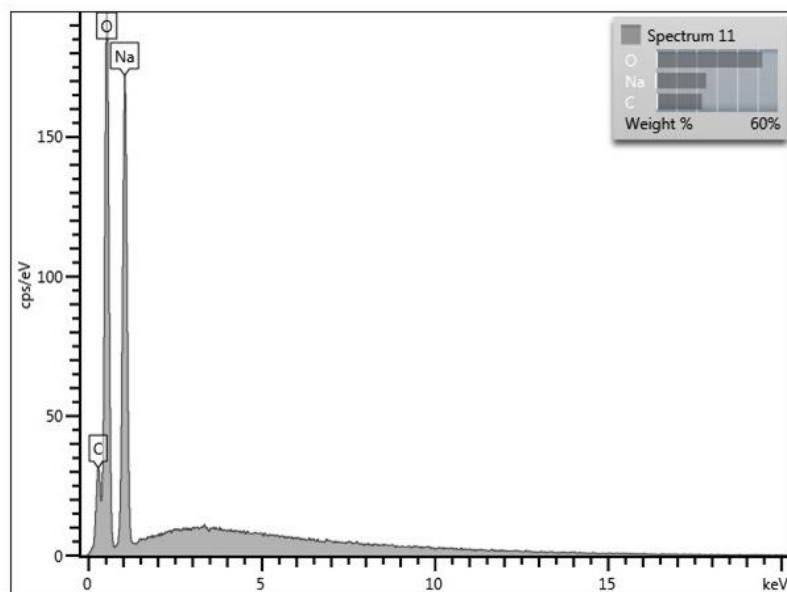
O resultado para a EDS do ácido cítrico demonstrou a presença de carbono (53,14%); oxigênio (46,26%) e alumínio (0,60%) – (Figura 25A). A amostra de bicarbonato de sódio apresentou carbono (22,75%); oxigênio (52,39%) e sódio (24,86%) – (Figura 25B). Na amostra de cloreto de sódio foi observada sódio (41,96%) e cloro (58,04%) – (Figura 25C).

Figura 25 – Espectrometria de microanálise elementar (EDS) da amostra dos reagentes utilizados nos produtos. Ácido cítrico (A); bicarbonato de sódio (B) e cloreto de sódio (C). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

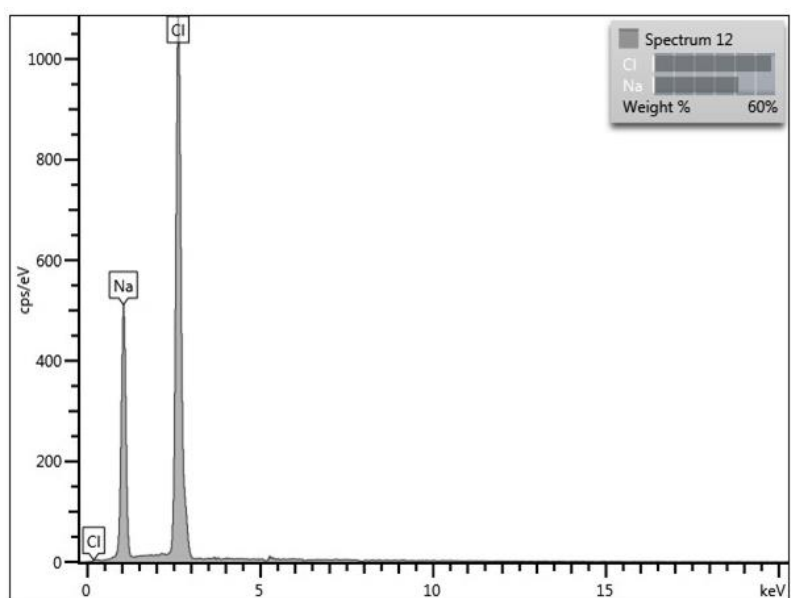


A

Element	Wt%	Wt% Sigma
C	53.14	0.39
O	46.26	0.39
Al	0.60	0.03
Total:	100.00	



B



C

Fonte: elaborada pela autora.

5.1.2 Ensaio na poliuretana

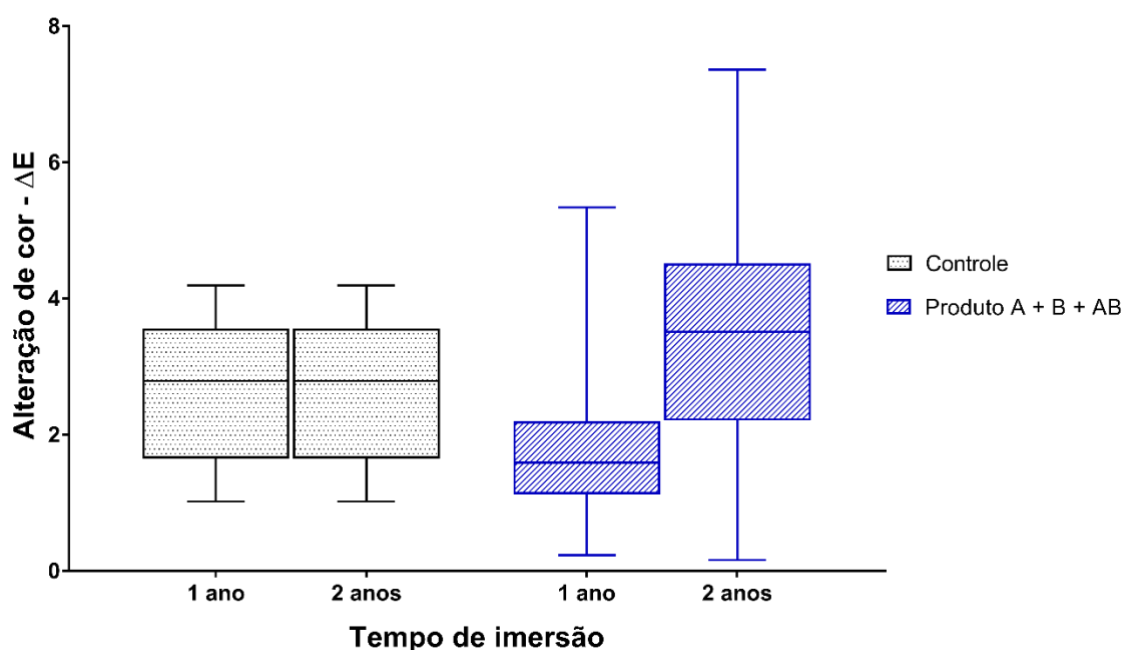
5.1.2.1 Ensaio de cor

Na avaliação da alteração de cor, após a imersão simulada por 1 e 2 anos em água e no emprego do protocolo com os produtos (A, B e AB), apenas a variável tempo teve efeito nos espécimes de poliuretana. A variável produto e a interação entre as variáveis (produto*tempo) não promoveram alterações estatisticamente significativas. Ao avaliar o tempo, independente do produto, foram observados maiores valores de ΔE após 2 anos de imersão, em relação a 1 ano ($p < 0,001$). De acordo com o sistema *National Bureau of Standards* (NBS), as alterações de cor após 1 ano (Média: 2,12) e 2 anos (Média: 3,67) de imersão em água (Média: 3,35) ou no emprego do protocolo

com os produtos (A, B e AB) – (Média: 2,58) foram categorizadas de perceptíveis a consideráveis, porém sem diferença entre os dois grupos.

Os resultados das comparações estatísticas e as medidas de tendência central estão apresentados na Tabela 3. A diferença entre os grupos é representada na Figura 26 (Apêndice E, F e G).

Figura 26 – Valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e o valor máximo dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de cor. Ribeirão preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

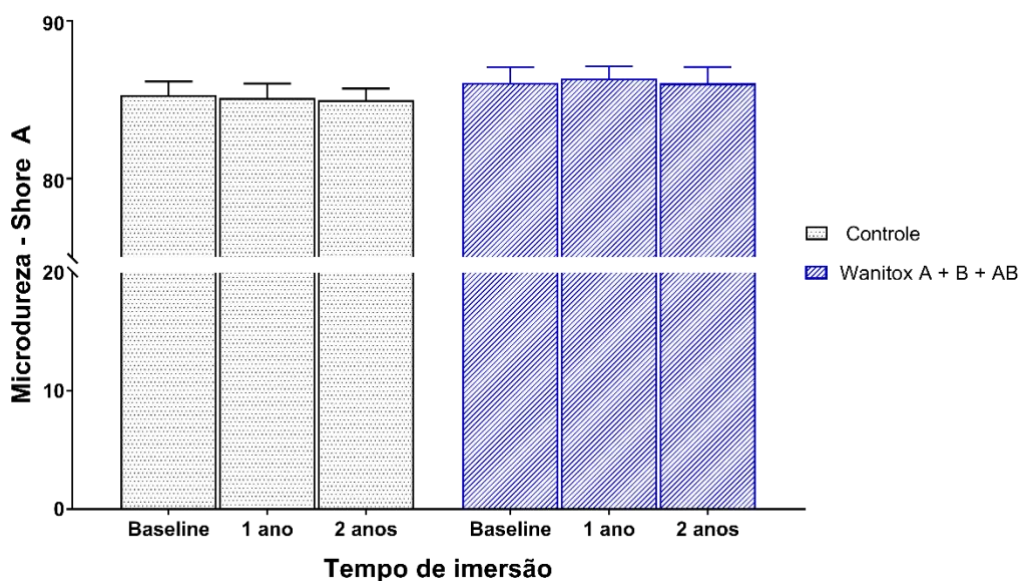
5.1.2.2 Ensaio de microdureza

Na avaliação da microdureza nas amostras de poliuretana, após a imersão simulada por 1 e 2 anos em água e no emprego do protocolo com os produtos (A, B e AB), somente a variável produto teve efeito estatisticamente significativo.

A variável tempo e a interação entre as variáveis (produto*tempo) não promoveram alterações estatisticamente significantes. Independente do tempo, ao comparar a imersão em água com o protocolo com os produtos observou-se maiores valores de microdureza (*Shore A*) para a imersão do protocolo de uso dos produtos [Média água: 85,21; média do emprego do protocolo com os produtos (A, B e AB): 86,22; $p < 0,001$].

Os resultados das comparações estatísticas e as medidas de tendência central são evidenciados na Tabela 3. Os valores de média e desvio padrão de cada grupo e tempo são representados na Figura 27 (Apêndice H, I e J)).

Figura 27 – Valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e o valor máximo dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de dureza na poliuretana. Ribeirão preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

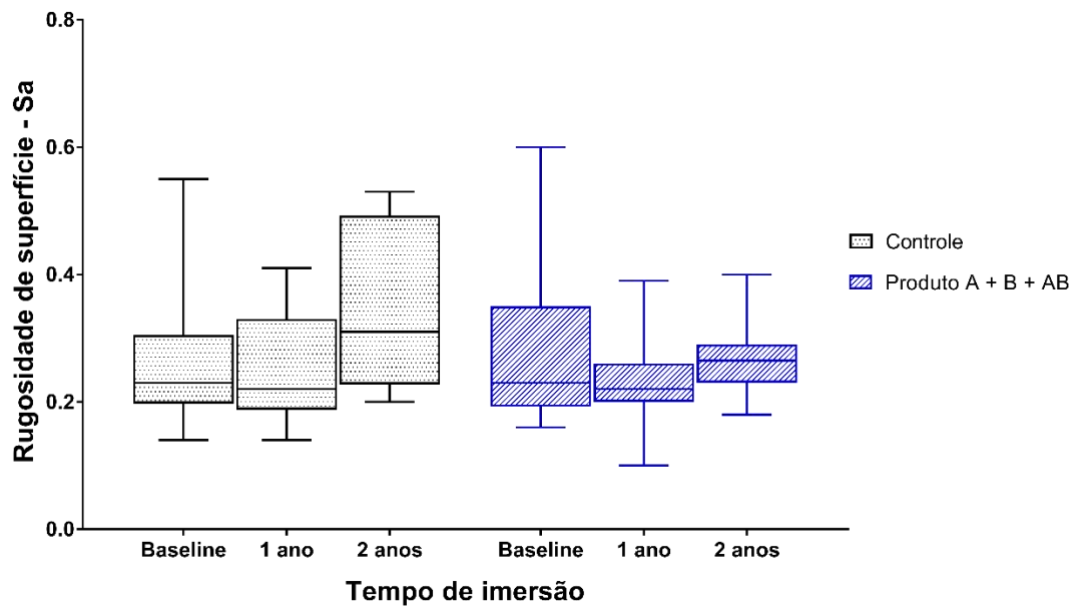
5.1.2.3 Ensaio de rugosidade de superfície

Na avaliação da rugosidade de superfície, após a imersão simulada por 1 e 2 anos em água e no emprego do protocolo com os produtos (A, B e AB), apenas a variável tempo teve efeito nas amostras de poliuretana.

A variável produto e a interação entre as variáveis (produto*tempo) não promoveram alterações estatisticamente significantes. Ao avaliar o tempo, independente do produto, foram observados maiores valores de rugosidade após 2 anos de imersão, em relação a 1 ano ($p=0,006$), porém com valores semelhantes à avaliação inicial (2 anos \times *baseline* – $p=0,081$).

A diferença entre os grupos é representada na Figura 28. Os resultados das comparações estatísticas e as medidas de tendência central estão expostos na Tabela 3 (Apêndice K).

Figura 28 – Valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e o valor máximo dos grupos experimentais com relação ao tempo no ensaio de rugosidade na poliuretana. Ribeirão preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 3 – Avaliação da alteração de cor (ΔE), microdureza (Shore A) e rugosidade de superfície (S_a) em espécimes de poliuretana após a aplicação dos protocolos de imersão por um período simulado de 1 e 2 anos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Tempo de imersão	Produto A+B+AB		Controle		Total produto	
	Média \pm DP (Mediana)	IC (Máximo – Mínimo)	Média \pm DP (Mediana)	IC (Máximo – Mínimo)	Média \pm DP (Mediana)	IC (Máximo – Mínimo)
Alteração de Cor - ΔE^*						
1 ano	1,74 \pm 1,15 (1,59)	1,20; 2,28 (0,23 - 5,34)	2,67 \pm 1,06 (2,79)	2,06; 3,27 (1,02 - 4,19)	2,12 \pm 1,19 (1,89) ^A	1,70; 2,54 (0,23 - 5,34)
2 anos	3,42 \pm 1,75 (3,51)	2,59; 4,24 (0,16 - 7,36)	4,03 \pm 2,06 (4,01)	2,83; 5,22 (1,11 - 7,52)	3,67 \pm 1,88 (3,58) ^B	3,01; 4,32 (0,16 - 7,52)
Total tempo	2,58 \pm 1,69 (2,21) ^a	2,03; 3,12 (0,16 - 7,36)	3,35 \pm 1,75 (3,35) ^b	2,67; 4,02 (1,02 - 7,52)		
Microdureza - Shore A**						
Baseline	86,09 \pm 0,99 (86,31)	85,62; 86,55 (83,60 - 87,40)	85,30 \pm 0,87 (85,37)	84,79; 85,80 (83,38 - 86,64)	85,76 \pm 1,01 (85,76)	85,41; 86,11 (83,38 - 87,40)
1 ano	86,36 \pm 0,77 (86,37)	86,00; 86,72 (84,80 - 88,46)	85,12 \pm 0,92 (85,33)	84,59; 85,65 (83,60 - 86,28)	85,85 \pm 1,03 (86,00)	85,49; 86,21 (83,60 - 88,46)
2 anos	86,05 \pm 1,04 (86,27)	85,56; 86,53 (83,88 - 87,52)	84,99 \pm 0,73 (85,08)	84,57; 85,41 (83,74 - 86,46)	85,61 \pm 1,05 (85,61)	85,24; 85,98 (83,74 - 87,52)
Total tempo	86,22 \pm 0,89 (86,37) ^a	85,94; 86,51 (83,60 - 88,46)	85,21 \pm 0,88 (85,37) ^b	84,87; 85,55 (83,38 - 86,64)		
Rugosidade de superfície- S_a^*						
Baseline	0,28 \pm 0,12 (0,23)	0,23; 0,33 (0,16 - 0,60)	0,26 \pm 0,10 (0,23)	0,20; 0,32 (0,14 - 0,55)	0,27 \pm 0,11 (0,23) ^{AB}	0,23; 0,31 (0,14 - 0,60)
1 ano	0,24 \pm 0,07 (0,22)	0,20; 0,27 (0,10 - 0,39)	0,24 \pm 0,08 (0,22)	0,20; 0,29 (0,14 - 0,41)	0,24 \pm 0,07 (0,22) ^A	0,21; 0,26 (0,10 - 0,41)
2 anos	0,27 \pm 0,06 (0,27)	0,24; 0,29 (0,18 - 0,40)	0,35 \pm 0,13 (0,31)	0,27; 0,42 (0,20 - 0,53)	0,30 \pm 0,10 (0,27) ^B	0,27; 0,34 (0,18 - 0,53)
Total tempo	0,26 \pm 0,09 (0,23) ^a	0,23; 0,29 (0,10 - 0,60)	0,28 \pm 0,11 (0,24) ^b	0,25; 0,32 (0,14 - 0,55)		

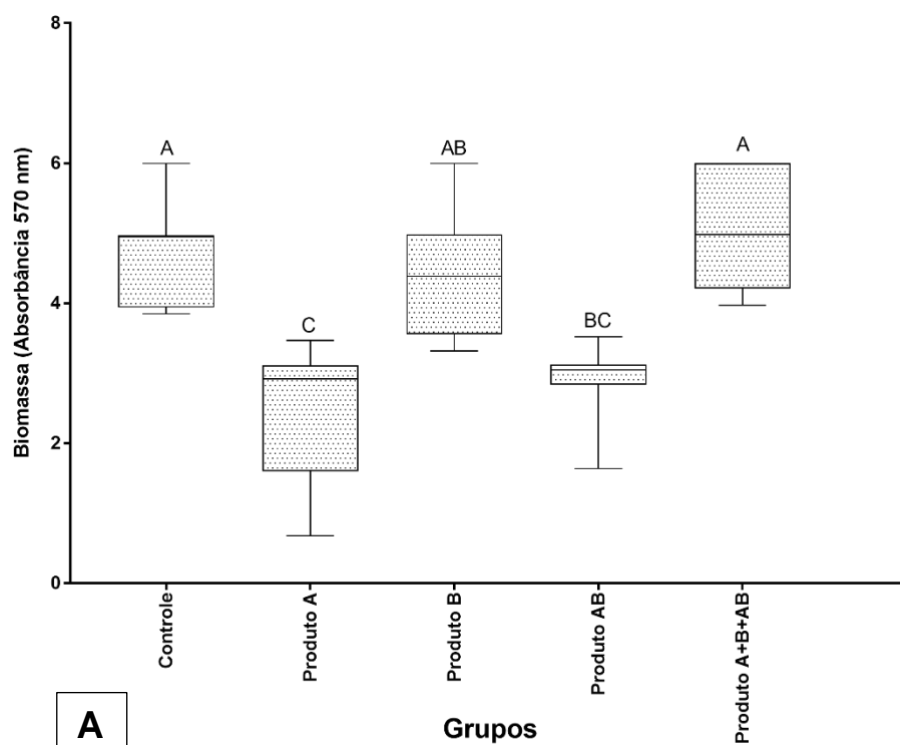
DP: Desvio Padrão. IC: Intervalo de confiança. * Análise não paramétrica para dados longitudinais em experimento fatorial (nparLD) de Brunner-Languer (Noguchi et al., 2012). **ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (tempo e produtos). ^{AB} letras maiúsculas indicam comparações entre tempos. ^{ab} letras minúsculas indicam comparações entre produtos. Letras iguais indicam semelhança estatística.

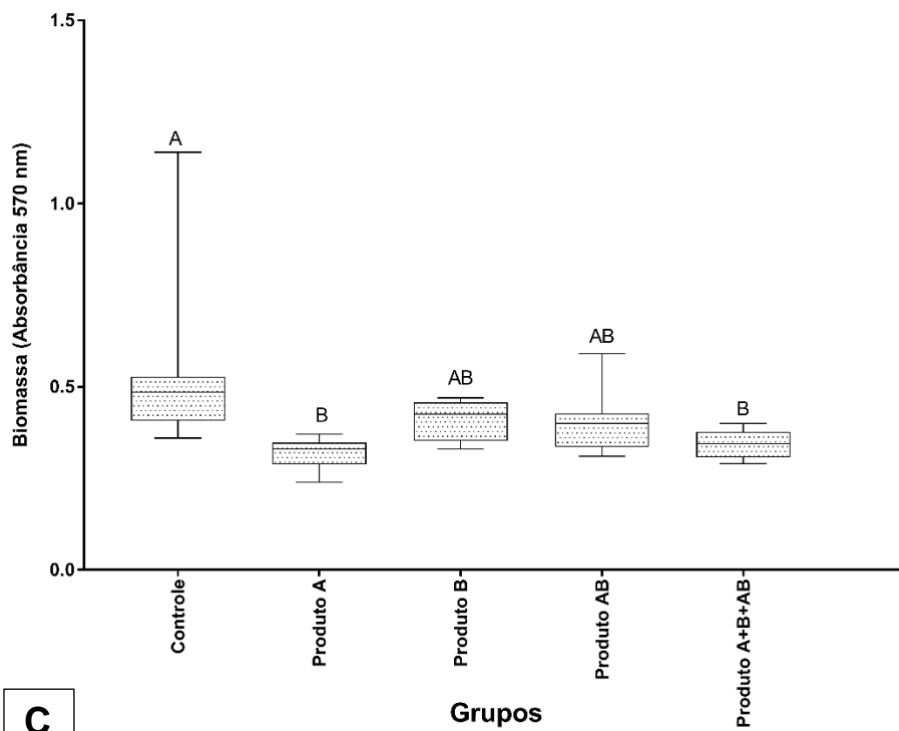
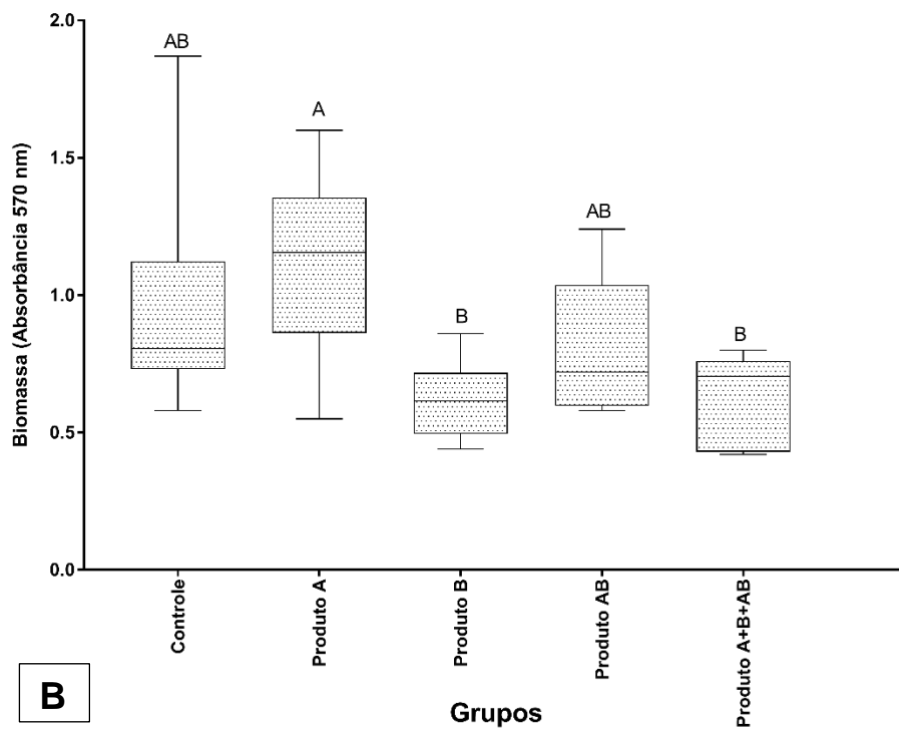
5.2 Ensaio biológicos

5.2.1 Quantificação da biomassa total

A avaliação da biomassa dos biofilmes por coloração com cristal violeta indicou que o Produto A ($p=0,003$) e o Produto AB ($p=0,019$) reduziram significativamente o biofilme de *P. aeruginosa* em comparação com o controle (Figura 29A). Por outro lado, a avaliação da biomassa do biofilme formado por *S. aureus* sugeriu que o Produto B ($p=0,018$) promoveu maior ação antibiofilme (Figura 29B). Em relação aos biofilmes formados por *E. coli*, o Produto A ($p=0,001$) e o emprego do protocolo completo com na sequência dos Produtos A + B + AB ($p=0,021$) foram os tratamentos mais eficientes para redução da biomassa (Figura 29C). Embora a coloração com cristal violeta tenha mostrado grandes variações na biomassa remanescente, a combinação dos produtos não potencializou a atividade antibiofilme em comparação à aplicação isolada. Os resultados das comparações estatísticas e as medidas de tendência central estão expostos na Tabela 4 (Apêndice L, M e N).

Figura 29 – Atividade antibiofilme de Produto A, Produto B, Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB na biomassa do biofilme (absorbância em 570 nm) de *P. aeruginosa* (A), *S. aureus* (B) e *E. coli* (C). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*; ^{ABC} Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p<0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.





Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 4 – Biomassa (absorbância 570 nm) de biofilme monoespécies formados por *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* após a aplicação dos protocolos de imersão. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

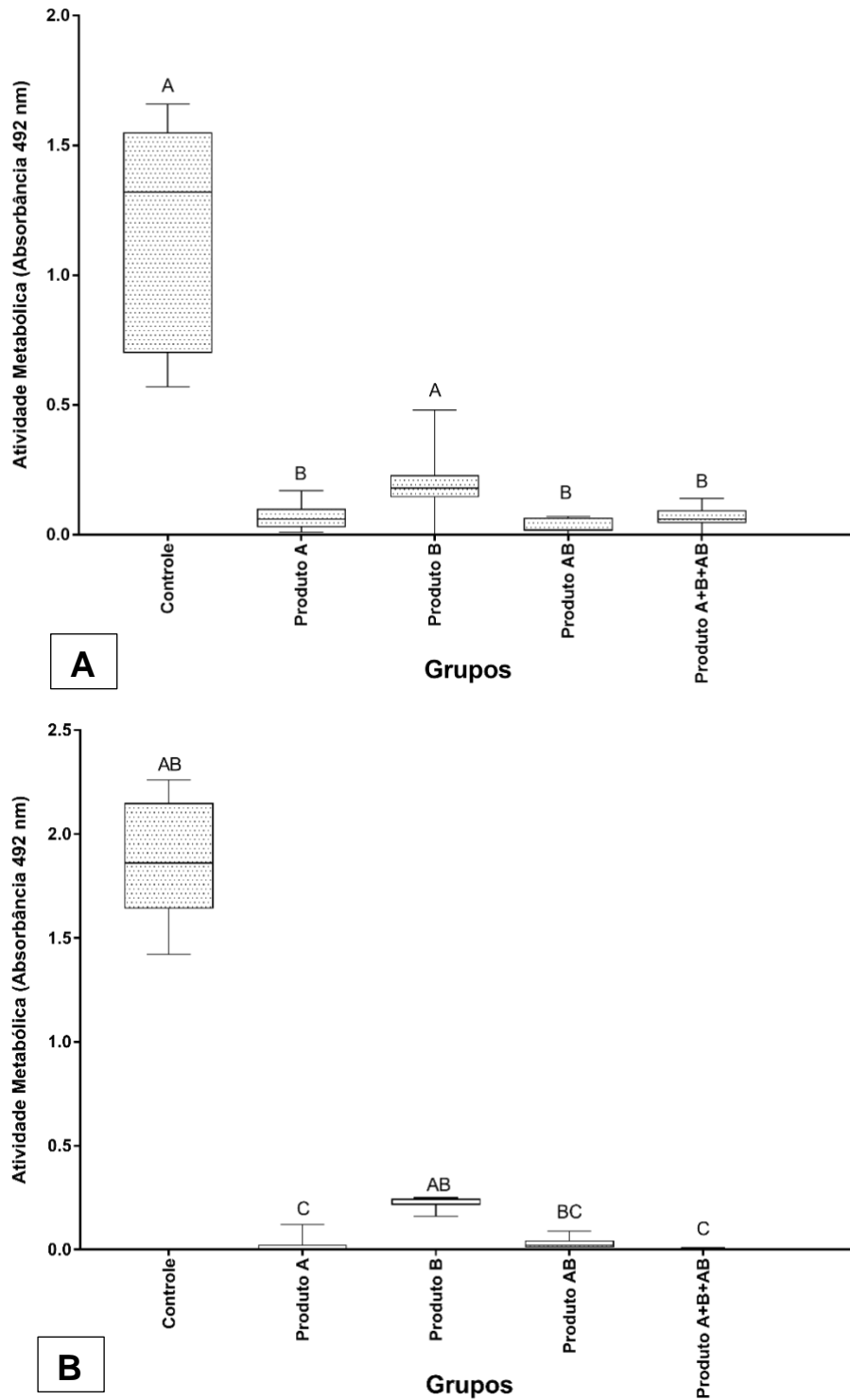
Bactérias	Produtos	Média ± DP (Mediana)	IC (Mínimo – Máximo)
<i>P. aeruginosa</i>	Controle	4,70 ± 0,74 (4,95) ^A	4,08; 5,31 (3,85 - 6,00)
	Produto A	2,50 ± 0,99 (2,92) ^C	1,68; 3,33 (0,68 - 3,47)
	Produto B	4,41 ± 0,94 (4,39) ^{AB}	3,63; 5,20 (3,32 - 6,00)
	Produto AB	2,91 ± 0,55 (3,05) ^{BC}	2,45; 3,37 (1,64 - 3,52)
	Produto A + B + AB	5,11 ± 0,85 (4,98) ^A	4,40; 5,81 (3,97 - 6,00)
	<i>p</i> [*]	<0,001	
<i>S. aureus</i>	Controle	0,95 ± 0,41 (0,80) ^{AB}	0,60; 1,29 (0,58 - 1,87)
	Produto A	1,13 ± 0,33 (1,16) ^A	0,85; 1,41 (0,55 - 1,60)
	Produto B	0,62 ± 0,14 (0,62) ^B	0,50; 0,74 (0,44 - 0,86)
	Produto AB	0,82 ± 0,25 (0,72) ^{AB}	0,61; 1,02 (0,58 - 1,24)
	Produto A + B + AB	0,62 ± 0,17 (0,70) ^B	0,48; 0,76 (0,42 - 0,80)
	<i>p</i> [*]	0,007	
<i>E. coli</i>	Controle	0,54 ± 0,25 (0,48) ^A	0,34; 0,75 (0,36 - 1,14)
	Produto A	0,32 ± 0,04 (0,33) ^B	0,28; 0,35 (0,24 - 0,37)
	Produto B	0,41 ± 0,06 (0,43) ^{AB}	0,36; 0,46 (0,33 - 0,47)
	Produto AB	0,41 ± 0,09 (0,40) ^{AB}	0,33; 0,48 (0,31 - 0,59)
	Produto A + B + AB	0,34 ± 0,04 (0,35) ^B	0,31; 0,38 (0,29 - 0,40)
	<i>p</i> [*]	0,001	

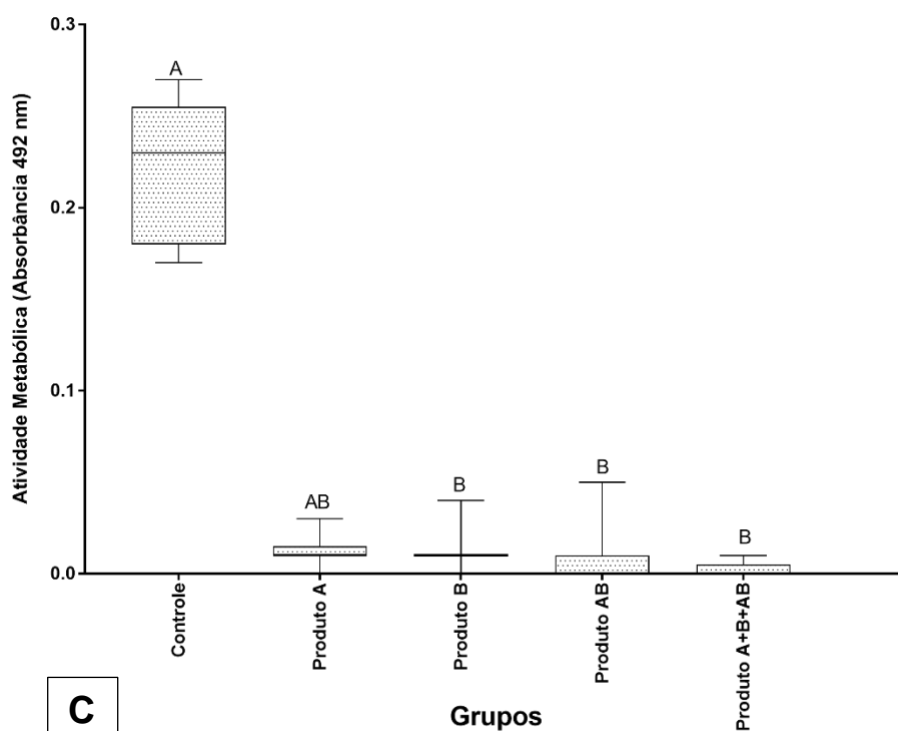
* *Kruskal–Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* com ajuste de *Bonferroni*; ^{AB} letras maiúsculas indicam comparações entre produtos para biomassa. ^{ab} letras minúsculas indicam comparações entre produtos para atividade metabólica. Letras iguais indicam semelhança estatística.

5.2.2 Mensuração da atividade metabólica

Em comparação com o controle, o tratamento com o Produto A ($p=0,001$), Produto AB ($p<0,001$) e na sequência dos Produtos A + B + AB ($p=0,002$) reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme de *P. aeruginosa* (Figura 30A). No biofilme formado por *S. aureus*, contrariando os resultados observados na avaliação da biomassa, o Produto B não promoveu mudanças substanciais na atividade metabólica (Produto A: $p<0,001$; Produto AB: $p=0,007$; sequência dos Produtos A + B + AB: $p<0,001$) – (Figura 30B). Considerando o biofilme formado por *E. coli*, observou-se que Produto B ($p=0,046$), Produto AB ($p<0,001$) e na sequência dos Produtos A + B + AB ($p<0,001$) promoveram redução da atividade metabólica (Figura 30C). Os resultados das comparações estatísticas e as medidas de tendência central estão expostos na Tabela 5 (Apêndice O, P e Q).

Figura 30 – Atividade antibiofilme de Produto A, Produto B, Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB na atividade metabólica do biofilme (absorbância em 492 nm) de *P. aeruginosa* (A), *S. aureus* (B) e *E. coli* (C). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*; ^{ABC} Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.





Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 5- Atividade metabólica (absorbância 492 nm) de biofilme monoespécies formados por *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* após a aplicação dos protocolos de imersão. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

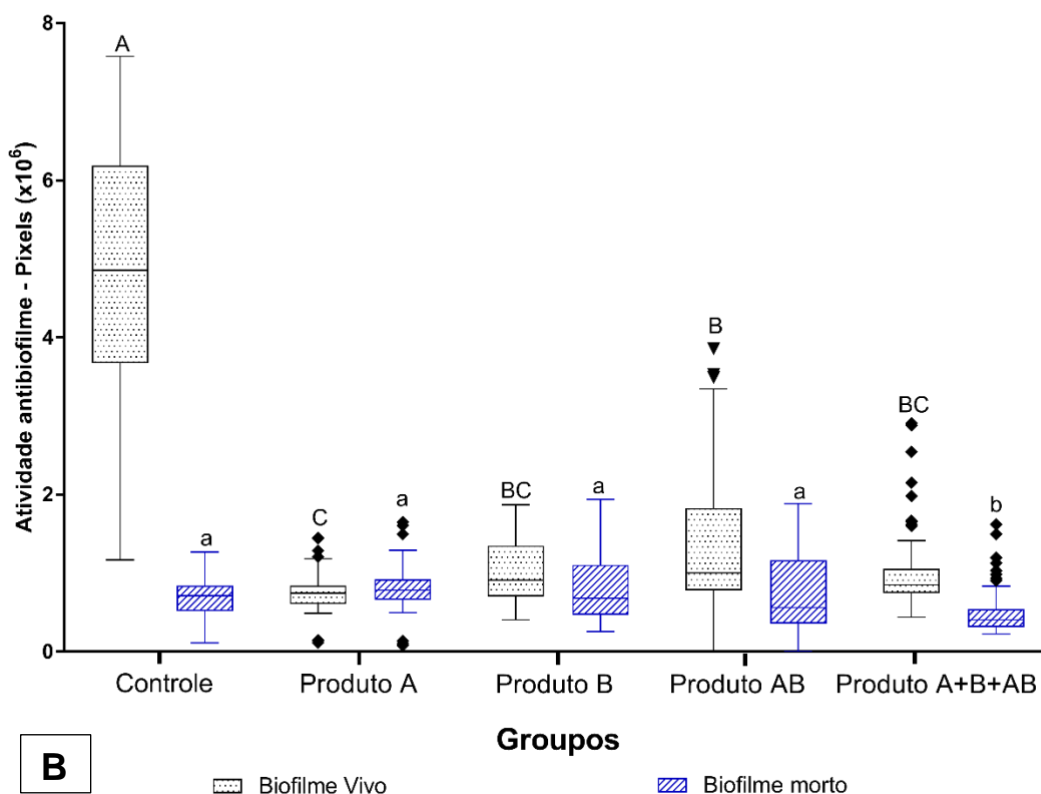
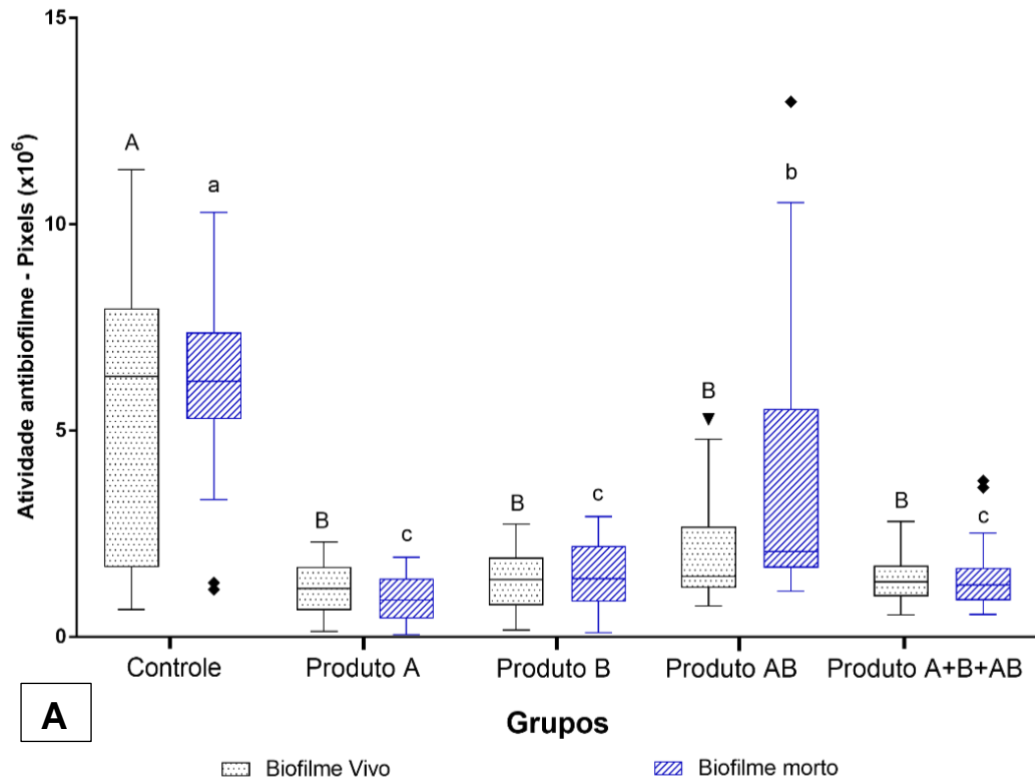
Bactérias	Produtos	Média ± DP (Mediana)	IC (Mínimo – Máximo)
<i>P. aeruginosa</i>	Controle	1,19 ± 0,42 (1,32) ^a	0,86; 1,51 (0,57 - 1,66)
	Produto A	0,07 ± 0,05 (0,06) ^b	0,03; 0,11 (0,01 - 0,17)
	Produto B	0,20 ± 0,13 (0,18) ^a	0,10; 0,29 (0,00 - 0,48)
	Produto AB	0,04 ± 0,03 (0,02) ^b	0,02; 0,06 (0,00 - 0,07)
	Produto A + B + AB	0,07 ± 0,04 (0,06) ^b	0,04; 0,10 (0,00 - 0,14)
	<i>p</i> [*]	<0,001	
<i>S. aureus</i>	Controle	1,86 ± 0,28 (1,86) ^a	1,64; 2,08 (1,42 - 2,26)
	Produto A	0,02 ± 0,04 (0,00) ^c	-0,01; 0,05 (0,00 - 0,12)
	Produto B	0,22 ± 0,03 (0,22) ^{ab}	0,20; 0,24 (0,16 - 0,25)
	Produto AB	0,03 ± 0,03 (0,02) ^{bc}	0,01; 0,05 (0,01 - 0,09)
	Produto A + B + AB	0,00 ± 0,01 (0,00) ^c	0,00; 0,01 (0,00 - 0,01)
	<i>p</i> [*]	<0,001	
<i>E. coli</i>	Controle	0,22 ± 0,04 (0,23) ^a	0,19; 0,25 (0,17 - 0,27)
	Produto A	0,01 ± 0,01 (0,01) ^{ab}	0,01; 0,02 (0,00 - 0,03)
	Produto B	0,01 ± 0,01 (0,01) ^b	0,00; 0,02 (0,00 - 0,04)
	Produto AB	0,01 ± 0,02 (0,00) ^b	-0,01; 0,02 (0,00 - 0,05)
	Produto A + B + AB	0,00 ± 0,00 (0,00) ^b	0,00; 0,00 (0,00 - 0,01)
	<i>p</i> [*]	<0,001	

* *Kruskal–Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* com ajuste de *Bonferroni*; ^{AB} letras maiúsculas indicam comparações entre produtos para biomassa. ^{ab} letras minúsculas indicam comparações entre produtos para atividade metabólica. Letras iguais indicam semelhança estatística.

5.2.3 Investigação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser

Em relação à atividade antibiofilme, observou-se redução significativa do biofilme total após o tratamento com o protocolo de uso dos produtos A, B e AB ($p < 0,001$), em relação ao controle (Tabela 6). Apesar da redução significativa ainda se observou agregados de biofilme residual, cobrindo extensa porção das superfícies, após imersão nos produtos. Considerando a quantidade de células vivas de *P. aeruginosa* (Figura 31 A) e *E. coli* (Figura 31 B), os tratamentos com Produto A e Produto B, quer ocorram juntos ou independentemente um do outro, foram semelhantes. Além disso, o tratamento com o Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB não promoveu diferença na quantidade de células vivas de *S. aureus*, em comparação ao controle, indicando que a combinação dos produtos não potencializou a atividade antibiofilme (Figura 31 C). A Figura 31 ilustra os resultados obtidos por microscopia confocal de varredura à laser após imersão no controle e nos produtos químicos (Apêndice R, S, T, U, V).

Figura 31 – Atividade antibiofilme do Produto A, Produto B, Produto AB e a sequência dos Produtos A + B + AB em biofilme monoespécie formado por *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B) e *S. aureus* (C). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*; ^{AB} letras maiúsculas indicam comparações entre produtos para biofilme vivo ^{ab} letras minúsculas indicam comparações entre produtos para biofilme morto. Letras iguais indicam semelhança estatística ($p < 0,05$). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



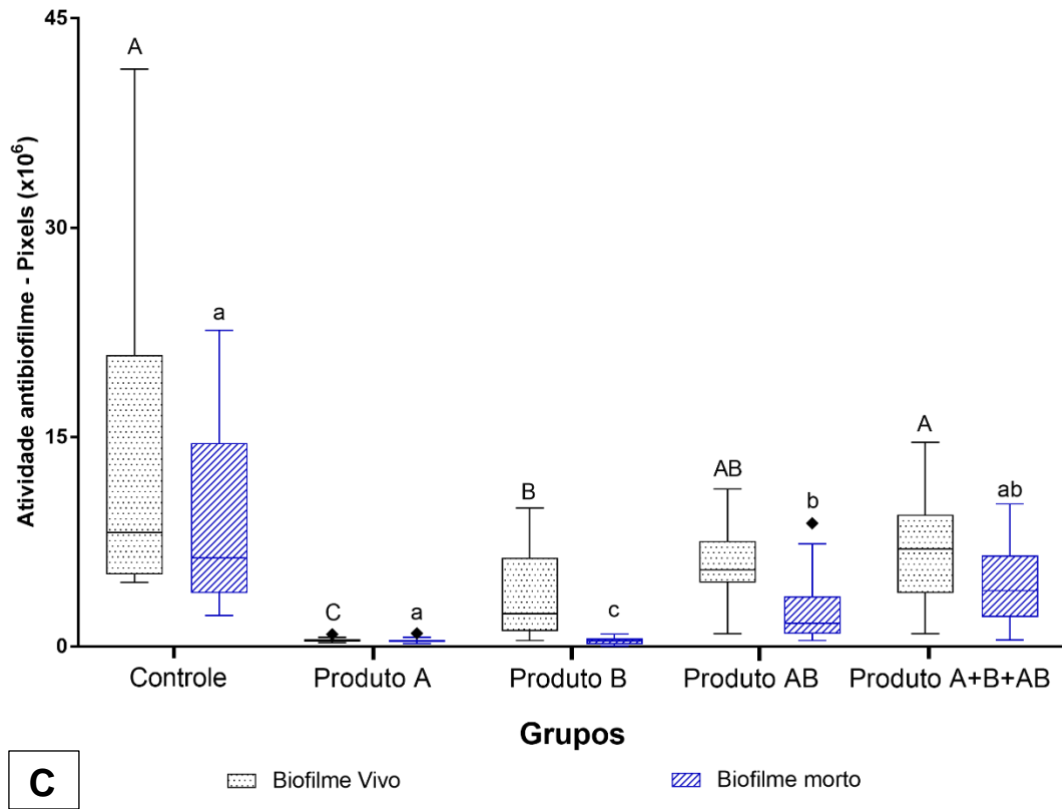
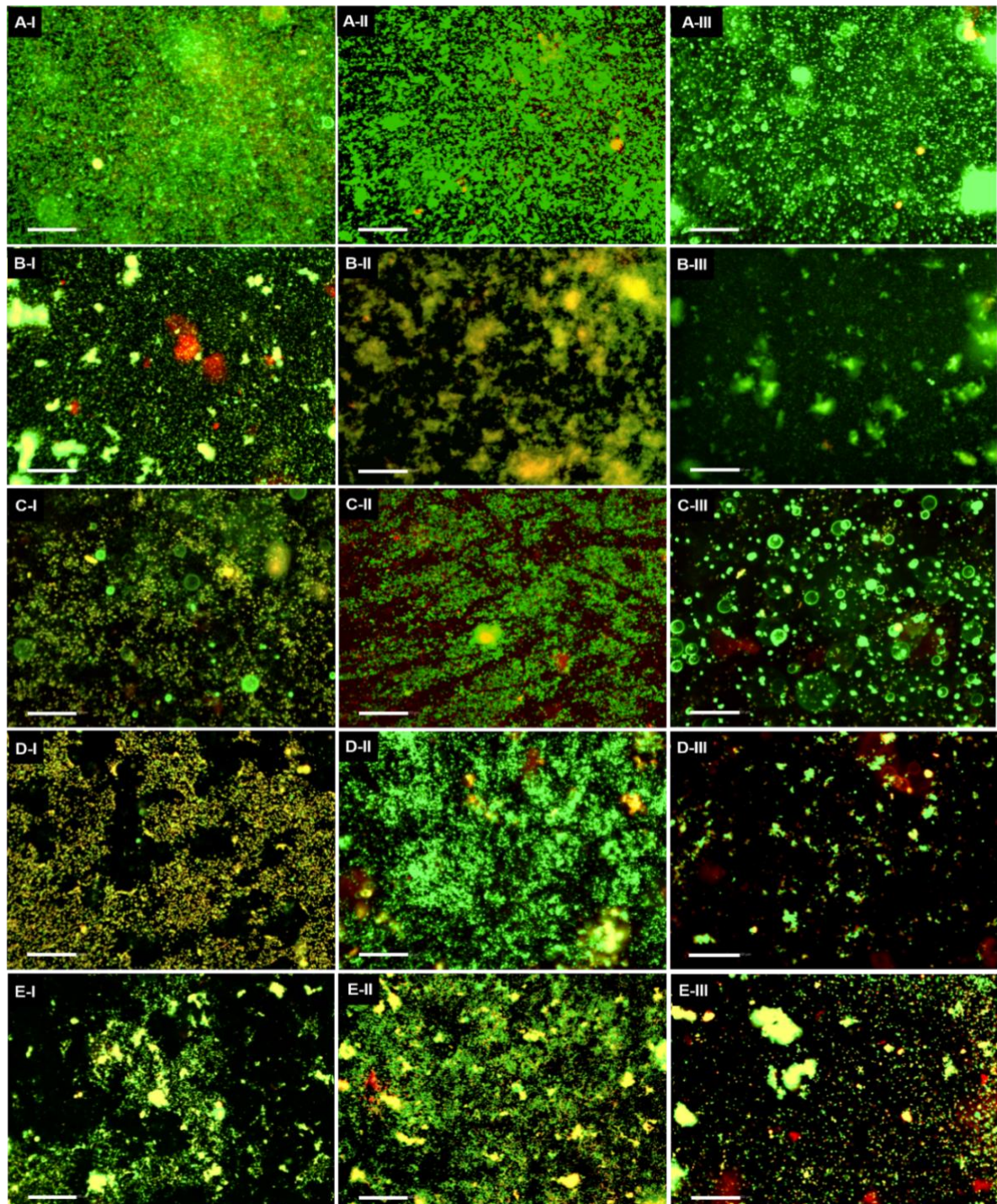


Tabela 6 - Atividade antibiofilme (pixels $\times 10^6$) de diferentes produtos contra biofilme monoespécies formados por *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*.

Bactérias	Produtos	Biofilme vivo		Biofilme morto	
		Média \pm DP (Mediana)	IC (Mínimo – Máximo)	Média \pm DP (Mediana)	IC (Mínimo – Máximo)
<i>P. aeruginosa</i>	Controle	7,05 \pm 2,24 (7,16) ^A	6,01; 8,10 (0,67 - 11,22)	6,78 \pm 1,81 (6,63) ^a	5,93; 7,63 (1,15 - 10,29)
	Produto A	1,17 \pm 0,60 (1,18) ^B	0,99; 1,35 (0,14 - 2,30)	0,95 \pm 0,56 (0,90) ^c	0,78; 1,12 (0,06 - 1,94)
	Produto B	1,37 \pm 0,71 (1,39) ^B	1,15; 1,58 (0,17 - 2,73)	1,49 \pm 0,82 (1,42) ^c	1,25; 1,74 (0,10 - 2,91)
	Produto AB	1,92 \pm 1,11 (1,53) ^B	1,58; 2,27 (0,75 - 5,28)	3,59 \pm 2,92 (2,09) ^b	2,69; 4,49 (1,11 - 12,97)
	Produto A + B + AB	1,40 \pm 0,54 (1,33) ^B	1,27; 1,52 (0,54 - 2,79)	1,38 \pm 0,63 (1,26) ^c	1,24; 1,53 (0,55 - 3,78)
	<i>p</i> [*]	< 0,001		< 0,001	
<i>S. aureus</i>	Controle	14,41 \pm 11,64 (8,18) ^A	8,97; 19,86 (4,59 - 41,37)	8,786 \pm ,36 (6,34) ^a	5,80; 11,76 (2,21 - 22,67)
	Produto A	0,44 \pm 0,13 (0,41) ^C	0,40; 0,48 (0,27 - 0,89)	0,42 \pm 0,14 (0,39) ^c	0,38; 0,46 (0,22 - 0,95)
	Produto B	3,66 \pm 2,87 (2,35) ^B	2,80; 4,52 (0,45 - 9,91)	0,41 \pm 0,24 (0,40) ^c	0,33; 0,48 (0,06 - 0,91)
	Produto AB	5,68 \pm 2,35 (5,50) ^{AB}	4,95; 6,40 (0,92 - 11,30)	2,51 \pm 2,09 (1,68) ^b	1,87; 3,16 (0,44 - 8,83)
	Produto A + B + AB	6,75 \pm 3,47 (7,00) ^A	5,95; 7,55 (0,91 - 14,62)	4,37 \pm 2,55 (3,99) ^{ab}	3,78; 4,95 (0,47 - 10,20)
	<i>p</i> [*]	< 0,001		< 0,001	
<i>E. coli</i>	Controle	5,31 \pm 1,49 (5,74) ^A	4,61; 6,01 (2,52 - 7,46)	0,82 \pm 0,24 (0,85) ^a	0,70; 0,93 (0,38 - 1,27)
	Produto A	0,76 \pm 0,28 (0,75) ^C	0,67; 0,84 (0,12 - 1,45)	0,80 \pm 0,32 (0,78) ^a	0,70; 0,89 (0,08 - 1,65)
	Produto B	1,02 \pm 0,42 (0,91) ^{BC}	0,89; 1,15 (0,41 - 1,87)	0,78 \pm 0,40 (0,68) ^a	0,66; 0,90 (0,26 - 1,94)
	Produto AB	1,45 \pm 0,93 (1,06) ^B	1,16; 1,74 (0,49 - 3,86)	0,77 \pm 0,50 (0,56) ^a	0,61; 0,92 (0,13 - 1,89)
	Produto A + B + AB	1,00 \pm 0,49 (0,85) ^{BC}	0,89; 1,12 (0,44 - 2,91)	0,49 \pm 0,28 (0,41) ^b	0,42; 0,55 (0,23 - 1,62)
	<i>p</i> [*]	< 0,001		< 0,001	

* *Kruskal–Wallis* seguido do pós-teste de Dunn com ajuste de *Bonferroni*; ^{AB} letras maiúsculas indicam comparações entre produtos para biofilme vivo. ^{ab} letras minúsculas indicam comparações entre produtos para biofilme morto. Letras iguais indicam semelhança estatística.

Figura 32 – Imagens fluorescentes representativas de *P. aeruginosa* (I), *S. aureus* (II) e *E. coli* (III) e após imersão em PBS - Controle (A), Produto A (B), Produto B (C), Produto AB (D) e protocolo com os produtos A, B e AB (E). Barra de escala = 50 µm. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

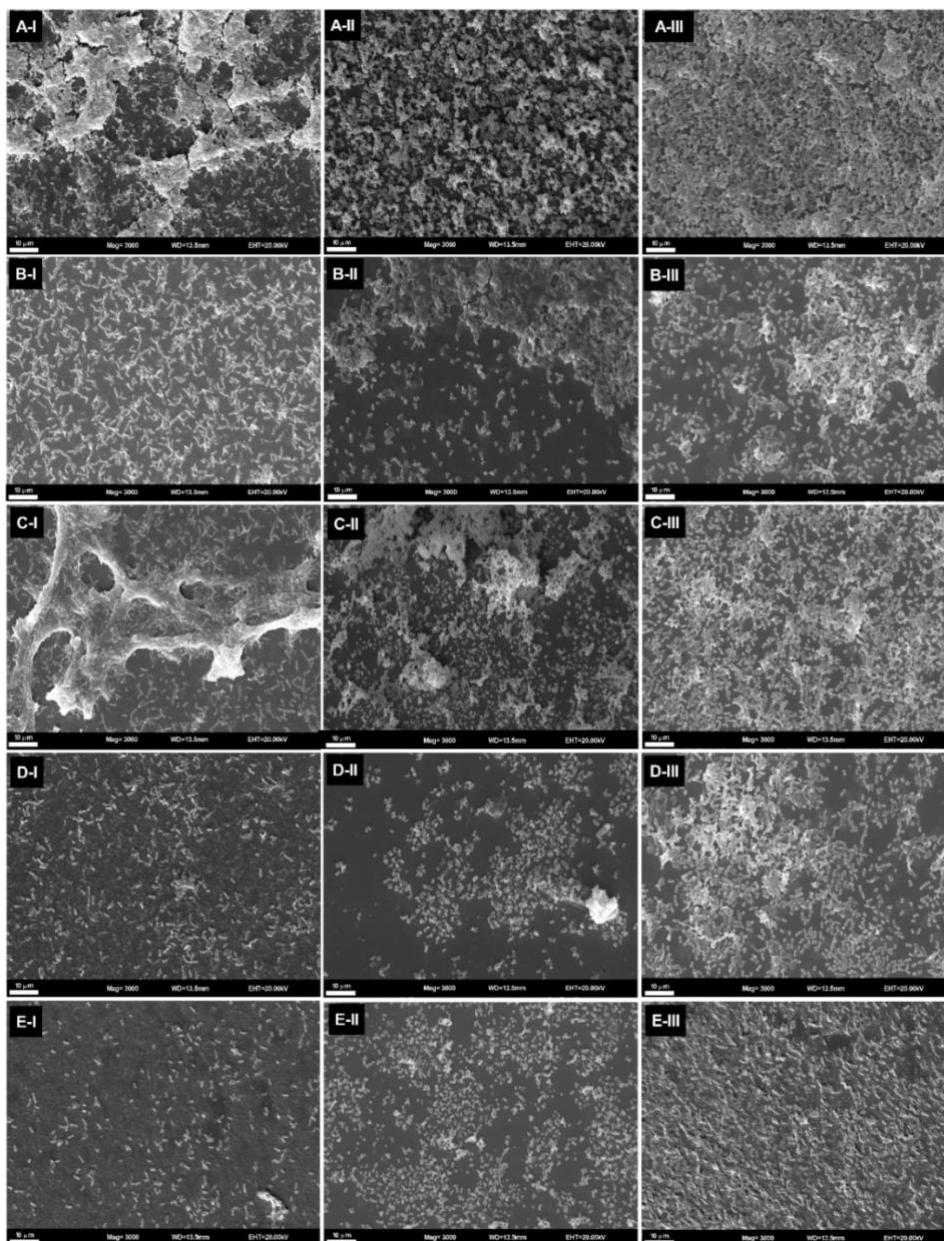


Fonte: elaborada pela autora.

5.2.4 Análise da morfologia estrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias (10.000 x) obtidas por MEV mostraram a redução do biofilme de forma significativa após o tratamento com a sequência do uso dos produtos A, B e AB com relação ao controle. Nota-se que a combinação do protocolo foi eficaz (Figura 33).

Figura 33 – Fotomicrografias por MEV representativas de *P. aeruginosa* (I), *S. aureus* (II) e *E. coli* (III) e após imersão em PBS - Controle (A), Produto A (B), Produto B (C), Produto AB (D) e protocolo com os produtos A, B e AB (E). Barra de escala = 10 µm. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.



Fonte: elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

A desinfecção química das linhas d'água de equipamentos odontológicos é uma medida fundamental para a prevenção da contaminação cruzada e manutenção do ambiente biologicamente seguro, visando à saúde e o bem-estar dos profissionais da odontologia e pacientes. Entretanto, um protocolo com o uso de agentes químicos deve ser realizado sem que ocorra danos aos diferentes materiais, que compõem as seringas triplices, as peças de mão de alta rotação e as linhas d'água de equipamentos odontológicos.

Nesta pesquisa, o ensaio de microdureza demonstrou que o tempo de exposição (1 e 2 anos), independente do produto (controle ou protocolo de produtos A, B e AB) reduziu os valores de microdureza das amostras de aço inoxidável.

Quanto ao ensaio de corrosão, o Produto A apresentou a maior tendência de corrosão das amostras de aço inoxidável, entretanto as densidades de corrente dos produtos (A, B e AB) foram melhores do que a do controle com o aço inoxidável atingindo um estado estacionário após 30 min de imersão.

Conforme Gentil (1996), o processo de corrosão ocorre devido à transformação das moléculas químicas que compõem determinado material a partir da sua eletrividade. Além da oxidação, que implica na perda de elétrons, pode acontecer um processo corrosivo como a da redução, que é quando há aumento no número de elétrons.

A corrosão é o resultado de um processo do meio em um determinado material, causando sua deterioração. Ademais, a corrosão eletroquímica é um processo espontâneo, que ocorre em meio aquoso quando o metal está em contato com um eletrólito, onde sucedem, simultaneamente, reação anódica (perda de elétrons) e catódica (ganho de elétrons) com a formação de uma pilha de corrosão (MERÇON, GUIMARÃES, MAINIER, 2004).

Os ensaios de composição química e estrutural da superfície das amostras de aço inoxidável do presente estudo demonstraram a presença de uma série de elementos químicos na superfície das amostras, após a imersão nos produtos (A, B e AB), com destaque para o ferro, carbono, sódio e oxigênio.

Os produtos A, B e AB apresentam as seguintes composições químicas: ácido cítrico e cloreto de sódio, bicarbonato de sódio e cloreto de sódio, e ácido cítrico, bicarbonato de sódio e cloreto de sódio, respectivamente (Tabela 1).

O ácido cítrico (C₆H₈O₆) está presente em diversos alimentos, como frutas,

vegetais e leite. Comercialmente, é disponibilizado como um pó branco cristalino e apresenta pH ácido, bem como diferentes aplicabilidades nas indústrias alimentícia e farmacêutica (abrandador de água, acidulante, conservante, emoliente, fixador de gás carbônico em bebidas, umectante) – (ARAÚJO,2017).

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) é um sal alcalino, comercialmente, na forma sólida cor branca e cristalina, solúvel em água. Apresenta aplicabilidades nas indústrias alimentícia e farmacêutica, bem como em uso doméstico para limpeza (DAMIÃO, 2017).

O cloreto de sódio (NaCl) é conhecido popularmente como sal de cozinha formado pela ligação iônica entre o cloro e o sódio, e comercializado em forma de pó branco e cristalino. Pode ser utilizado como conservante de alimentos e tempero, sendo os íons cloro e sódio fundamentais para a vida dos seres humanos. No entanto, vale mencionar, que o excesso do cloreto de sódio na dieta pode ocasionar a hipertensão arterial (MARTEL; CASSIDY, 2004).

No ensaio de cor, os corpos de prova de poliuretana foram avaliados criticamente por meio da alteração de cor (ΔE), que foi quantificada pelas unidades da *National Bureau of Standards* (NBS), como diferença de cor (NIMEROFF, 1968).

Independentemente da imersão das amostras de poliuretana em água ou nos produtos (A, B e AB), houve uma alteração na cor, que esteticamente não é relevante para as linhas d'água dos equipos odontológicos, pois a descoloração ocorreria na parte interna. Entretanto, outros estudos são necessários para avaliar o grau de resíduos de corante da poliuretana, que poderiam migrar das linhas d'água de equipos odontológicos para a água e, conseqüentemente, expor os pacientes atendidos na odontologia ao longo do tempo.

No presente estudo, em decorrência do aumento da microdureza e da rugosidade de superfície das amostras de poliuretana após a imersão simulada por 1 e 2 anos em água e no emprego do protocolo com os produtos (A, B e AB) recomenda-se a substituição periódica das linhas d'água de equipos odontológicos, pois estas alterações podem propiciar a retenção de sujeira e formação de biofilme.

O biofilme formado nos reservatórios e, principalmente, nas linhas d'água dos equipos odontológicos representam uma problemática real no que tange à contaminação microbiana da água e, por conseguinte, um risco potencial de contaminação cruzada aos profissionais da odontologia, pacientes e ambiente odontológico (LIZZADRO et al., 2019; OFFNER et al., 2020; WATANABE;

MONTEIRO; SOUZA, 2021).

Para o enfrentamento desta importante fonte de contaminação/infecção no ambiente odontológico, diferentes substâncias [ácido peracético (TUVO et al. 2020); bicarbonato de sódio (GAWANDE et al., 2008); dióxido de cloro (PATEL; DESAI; OWEN, 2016); íons de plasma (NOOPAN et al., 2019); prata nanométrica (CHENG et al., 2021); percarbonato de sódio (PATEL; DESAI; OWEN, 2016); peróxido de hidrogênio (TUVO et al. 2020); e quaternários de amônio (TUVO et al. 2020)] e produtos químicos [*Alpron* (BAUDET et al., 2020); *Aniosyme X3* (OFFNER et al., 2020); *Bilpron* (BAUDET et al., 2020); *Biofilm-Removing-System* (BAUDET et al., 2020); *Calbenium*[®] (OFFNER et al., 2020)] foram avaliados *in vitro* (PATEL; DESAI; OWEN, 2016; NOOPAN et al., 2019; TUVO et al. 2020; e CHENG et al., 2021) e em campo, com emprego direto nos equipos odontológicos (LIZZADRO et al., 2019; NOOPAN et al., 2019; BAUDET et al., 2020; OFFNER et al., 2020; TUVO et al. 2020).

O dióxido de cloro em concentrações reduzidas (sistemas estático e em fluxo contínuo) diminuiu o biofilme misto *in vitro* e, conseqüentemente, apresentou potencial para ser empregado durante o tratamento odontológico de pacientes, com vistas ao controle da formação do biofilme em linhas d'água de equipos odontológicos (PATEL; DESAI; OWEN, 2016).

Lizzadro et al. (2019) relataram que o tanque de armazenamento de água, a ausência de válvulas antirrefluxo e os procedimentos de desinfecção realizados são considerados os principais pontos críticos de contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos. Ademais, a microbiota da água dos equipos odontológicos pode variar em relação ao tipo de água e, principalmente, aos procedimentos realizados, sinalizando para a importância do monitoramento da qualidade microbiológica da água, visando a sua potabilidade.

Em 2019, Noopan et al. evidenciaram que emprego de íons de plasma com a água eletroquimicamente ativada reduziu eficientemente a formação de biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos, bem como a contaminação bacteriana da água, no entanto não foi capaz de eliminar o biofilme.

Diferentes formulações desinfetantes com prata nanométrica mostraram atividade bacteriostática ao longo do tempo para o enfrentamento de biofilmes provenientes de linhas d'água de equipos odontológicos (CHENG et al., 2021).

Em 2020, Baudet et al. implementaram um protocolo que incluiu a desinfecção de choque, contínua e intermitente. Ainda, água esterilizada e desinfecção regular dos

reservatórios, que foi eficiente no controle da contaminação bacteriana a longo prazo.

O protocolo de desinfecção de choque com peróxido de hidrogênio e surfactantes a 4 % sinalizaram como alternativa promissora para redução da contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos e, a longo prazo, controle do biofilme (TUVO et al. 2020).

Nesta pesquisa, três diferentes produtos químicos (A, B e AB) foram avaliados *in vitro* na forma de protocolo de uso contra biofilmes cultivados com monoculturas de cepas padrão de *P. aeruginosa* (LIZZADRO et al., 2019; BAUDET et al., 2020; OFFNER et al., 2020), *S. aureus* (PATEL; DESAI; OWEN, 2016) e *E. coli* OFFNER et al., 2020), por apresentarem características morfológicas, bioquímica e fisiológicas diferentes e representarem relevância como microbiota presente nas linhas d'água de equipos odontológicos.

No que concerne as linhas d'água de equipos odontológicos, diferentes técnicas empregadas nos estudos analisaram os biofilmes com auxílio de microscópio confocal de varredura à laser (LIN et al., 2011; PUTTAIAH et al., 2012) com *BacLight* (PERCIVAL et al., 2009; BANSAL et al., 2011) e microscópio eletrônico de varredura (MEV) – (LAL et al., 2015; SHAJAHAN et al., 2017; NOOPAN et al. 2019).

Nas amostras desta pesquisa, a quantificação da biomassa total do biofilme (violeta cristal), a mensuração atividade metabólica das células bacterianas (XTT), a viabilidade das células bacterianas no biofilme [microscopia confocal de varredura à laser (*Operetta CLS High-Content*) com *FilmTracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit*] e a análise da morfologia estrutural do biofilme (MEV) foram as técnicas microbiológicas utilizadas para avaliar a atividade antibiofilme do protocolo de uso dos produtos (A, B e AB).

Cabe salientar que os nossos produtos (A, B e AB) permaneceram em contato com os biofilmes (*P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*) por somente alguns minutos e mesmos assim apresentaram atividade antibiofilme, sendo que a literatura científica referencia o uso de substâncias e produtos por um período mais prolongado (PERCIVAL et al., 2009; LIN et al., em 2011; BOWEN et al., 2015; HIKAL, ZAKI, SABRY, 2015; DITOMMASO et al., 2016; LIZON et al., 2016).

Os produtos A e AB apresentaram resultados promissores contra *P. aeruginosa* e *E. coli*, ao reduzir a quantificação da biomassa total e da atividade metabólica no biofilme. Segundo Ocaña-Morgner (2001), as bactérias gram-negativas são susceptíveis ao ácido cítrico.

Por outro lado, Dobay (2018) descreveu a inibição da formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *E. coli* pelo bicarbonato de sódio, entretanto no nosso estudo, o produto B diminuiu a biomassa total e a atividade metabólica nos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Outras pesquisas demonstraram atividades antibiofilmes do bicarbonato de sódio contra bactérias e fungos (GAWANDE et al., 2008), bem como a inibição da formação *in vitro* de biofilmes bucais (PRATTEN et al. 2016)

Assim, os produtos A e B apresentam pH ácido e alcalino, respectivamente, que conforme Padan et al. (2005), geram uma pressão seletiva ambiental que influencia no crescimento ou morte bacteriana.

É importante reportar que o Produto AB gera uma efervescência ao ser adicionado em água, por meio da reação do ácido cítrico com o bicarbonato de sódio e a formação de cloreto de sódio, água e liberação de dióxido de carbono (CO₂) na forma de gás, que podem contribuir na desorganização mecânica e química do biofilme.

Acerca da viabilidade das células bacterianas e a morfologia estrutural do biofilme, os tratamentos com Produto A e Produto B, quer ocorram juntos ou em sequência ou independentemente um do outro, foram semelhantes.

Ressalta-se que os produtos utilizados de forma consecutiva não representaram a realidade do protocolo proposto para a aplicabilidade nas linhas d'água dos equipamentos odontológicos ao longo do tempo, uma vez que foram implementados intervalos curtos para viabilizar os experimentos microbiológicos *in vitro*, e as ações antimicrobianas dos produtos podem ter sido neutralizadas. Mesmo com o enxágue dos corpos de prova de poliuretano com água, a atividade antibiofilme demonstrou ser eficiente e, em exposições prolongadas, películas dos produtos podem ser formadas nas superfícies das amostras, criando uma barreira protetora contra a aderência microbiana e a formação de biofilme.

Desta forma, entendemos que o biofilme é uma verdadeira fonte de contaminação microbiana (células planctônicas e sésseis) altamente resistente aos agentes antimicrobianos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017), pois após ser formado não há meio químico capaz de removê-lo, completamente.

O monitoramento da qualidade microbiológica da água dos equipamentos odontológicos pode ser considerado útil não apenas para avaliar a eficácia das

medidas preventivas e de enfrentamento, mas também como um guia para a escolha de estratégias corretivas no que tange esta problemática (BAUDET et al., 2020).

As limitações do presente estudo são decorrentes do seu desenho experimental *in vitro* com biofilmes em monoculturas, que contrapõem a realidade dos biofilmes multiespécies presentes, diariamente, nas linhas d'água de equipamentos odontológicos em atividades clínicas.

Em suma, a avaliação do protocolo de uso dos produtos químicos (A, B e AB) demonstrou possível aplicabilidade para o enfrentamento do biofilme formado nas linhas d'água de equipamentos odontológicos com preservação das propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais (linhas d'água de poliuretano e peças de mão de seringa tríplice e alta rotação de aço inoxidável) ao longo do tempo. Outrossim, no Brasil, ainda não há produto comercial registrado na ANVISA, que apresente atividade antibiofilme e para esta finalidade, demonstrando a inovação, a aplicabilidade e a importância desta pesquisa para a biossegurança: controle de contaminação/infecção no ambiente odontológico.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia e as condições experimentais desta pesquisa foi possível concluir que:

- ✓ Com relação à alteração da microdureza no aço inoxidável após a imersão simulada por 1 e 2 anos nos produtos, não houve diferença dos resultados com o grupo controle, inferindo que peças de mão de aço inoxidável (seringa tríplice e alta rotação) possam proceder da mesma maneira;
- ✓ Decorrida a exposição aos produtos e grupo controle, a maioria das amostras de aço inoxidável apresentou tendência à corrosão e corroborada, rotineiramente, na realidade do ambiente odontológico;
- ✓ Houve alterações de cor, microdureza e rugosidade nas superfícies de poliuretana após a imersão simulada por 1 e 2 anos dos produtos, e do grupo controle, salientando a importância da substituição frequente das linhas d'água de equipos odontológicos antigas por novas;
- ✓ A quantificação da biomassa total, atividade metabólica e viabilidade das células nos biofilmes monoespécies mostraram atividade antibiofilme eficiente com o uso dos produtos de maneira isolada, em conjunto ou sequencial, e promissora aplicabilidade nas linhas d'água de equipos odontológicos;
- ✓ As morfologias estruturais dos biofilmes monoespécies foram alteradas com as diferentes exposições aos produtos, no que concernem a matriz de substâncias poliméricas extracelulares e as células bacterianas, no entanto a eliminação total do biofilme não foi alcançada, e pode ser evidenciado na realidade clínica das linhas d'água de equipos odontológicos.

Assim, os produtos analisados nesta pesquisa mostraram potencial inovador para o enfrentamento do biofilme linha d'água dos equipos odontológicos, preservando as propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais.

REFERÊNCIAS²

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

AGAHI, R. H.; et. al. Effect of 0.2% chlorhexidine on microbial and fungal contamination of dental unit waterlines. **Dental Research Journal**, v. 11, n. 3, p. 351–356, 2014.

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

ARAÚJO, E. M.R. Extração líquido-líquido de ácido cítrico: estudo em bancada e em coluna mecanicamente agitada. 2017. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal De Minas Gerais, Minas Gerais, 2017.

ARRUDA, C. N. F. Avaliação do hipoclorito de sódio e solução de mamona (*Ricinus communis*) quanto à eficácia do controle do biofilme de próteses totais e efeitos adversos sobre a resina acrílica termicamente ativada. 2015. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

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

BARBOT, V.; et. al. Efficacy of dental unit disinfectants against *Candida* spp. and *Hartmannella vermiformis*. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 289-96, 2014.

BAUDET, A. et. al. Efficacy of BRS[®] and Alpron[®]/Bilpron[®] Disinfectants for Dental Unit Waterlines: A Six-Year Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.8, p. 2634, 2020.

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

BOWEN, C. G. et al. 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 nº888 de 4 de maio de 2021. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 abril. 2021.

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.

² De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

COLEMAN, D. C. et. al. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1424-37, 2009.

COSTA, D. et. al. Efficacy of dental unit waterlines disinfectants on a polymicrobial biofilm. **Water Research**, v. 91, p. 38-44, 2016.

COSTA, D. et. al. Occurrence and diversity of both bacterial and fungal communities in dental unit waterlines subjected to disinfectants. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 7, 2016.

CHENG, L.; et. al. Bacteriostatic effects of nanometer silver disinfectant on the biofilms in dental unit water lines. **Journal of Dental Sciences**, v. 16, n. 1. P.327-332, 2021.

DALLOLIO, L. et. al. 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.

DAMIÃO, D. Produto de hidrogênio em geradores com diferentes soluções. 2017. 34f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade deferel da fronteira sul. Cerro Largo, RS, 2017.

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

DOBAY, O. et al. Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2245, 2018.

FARIA, A. C.L. **Avaliação de ligas experimentais de titânio para utilização em estruturas metálicas de próteses dentárias**. 2009. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

GAWANDE, P. V. et al. 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.

GENTIL, Vicente. **Corrosão**. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996.

GIACOMUZZI, M.; ZOTTI, C. M.; DITOMMASO, S. Colonization of Dental Unit Waterlines by *Helicobacter pylori*: Risk of Exposure in Dental Practices. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 16, p. 2981, 2019.

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

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Candida albicans and Candida dubliniensis: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. **British Journal of Biomedical Science**, London, v. 63, n. 1, p. 6-11, 2006.

HENRIQUES, M. At al. Influence of sub-inhibitory concentrations of antimicrobial agents on biofilm formation in indwelling medical devices. **The International journal of Artificial Organs**, v. 28, n. 11, p. 1181- 1185, 2005.

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.

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

KRAMER, A. et al. Evaluation of the PotoClean[®] decontamination technology for reprocessing of water supply lines in dental units during routine work. **GSM Krankenhaushygiene Interdisziplinär**, v. 7, n. 1, 2012.

LAL, S. Et al. Risk Assessment for the spread of *Serratia marcescens* within dental-unitwaterline systems using *Vermamoeba vermiformis*. **Current microbiology**, v. 71, n. 4, p. 434-442, 2015.

LIN, S. M. et al. 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. et al. 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. et al. Comparison between Two Types of Dental Unit Waterlines: How Evaluation of Microbiological Contamination Can Support Risk Containment. **International journal of environmental research ans public health**. v. 16, n. 3, p.328, 2019.

MARTEL, B. Cassidy,k. Chemical Risk Analysis: A Practical Handbook. Butterworth–Heinemann. p. 361, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.

MERÇON, F.; GUIMARÃES, P. I.; MAINIER, F. B. Corrosão: um exemplo usual de fenômeno químico. **Revista Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 19, p. 11-14, 2004.

- MILLS, S. E.; KARPAY, R. I. Dental waterlines and biofilm-searching for solutions. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 23, n. 3, p. 237-258, 2002.
- MONTEIRO, R.M. **Qualidade da água em clínica odontológica na perspectiva microbiológica: uma proposta de intervenção**. 2018 76 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo; São Paulo, 2018.
- MONTEIRO, R. M. et al. Evaluation of a protocol for reducing the microbial contamination of dental unit water. **Acta Odontologica Latinoamericana**. 2018 ;31(3):138-143.
- NIMEROFF, I. Colorimetry National Bureau of Standards. 1968. 104 f. Monografia - Washington DC: US Government Printing Office; 1968.
- NOGUCHI, K. et al. An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. **Journal of Statistical Software**., v. 50, p.1-23, 2012.
- NOOPAN, S. et al. Plasma Sterilization Effectively Reduces Bacterial Contamination in Dental Unit Waterlines. **International journal of dentistry**. 2019.
- OCAÑA-MORGNER C, DANKERT JR. Induction of complement sensitivity in *Escherichia coli* by citric acid and low pH. **Journal of Applied Microbiology**. 2001 v.90, n. 5, p.771-778, 2021.
- O'DONNELL, M. J. et al. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. **Future Microbiology**, v. 6, n. 10, p.1209-1226. 2011.
- OFFNER, D. et al. Mobile Dental Delivery System: An Effective Protocol for Hygiene and Disinfection. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.5, p. 1603, 2020.
- OLIVEIRA, V. C. et al. Expression of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after bacteriophage infection. **Microbial Pathogenesis**. V.154, 2021.
- Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1717, n. 2, p.67-88, 2005.
- PARANHOS, H. F. O. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of alkaline peroxide solutions in reducing the viability of specific biofilms. **The American Journal of Dentistry**, v. 32, p.201-207, 2019.
- PAREEK, S. et al. Disinfection of Dental Unit Water Line Using Aloe Vera: *In Vitro* Study. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.
- PATEL, M. DESAI, J.; OWEN, P. C. The efficacy of disinfectants in the decontamination of dental unit water lines: an in vitro laboratory study. **BDJ Open**, v. 2, 2016.

- PAWAR, A. et al. Breaking the Chain of Infection: Dental Unit Water Quality Control. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 7, p. ZC80-ZC84, 2016.
- PERCIVAL, R.S. et al. Control of microbial contamination in dental unit water systems using tetra-sodium EDTA. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1081-1088, 2009.
- PETTI, S.; POLIMENI, A.; ALLEN, M, J. Dental unit water treatment with hydrogen peroxide and monovalent silver ions artificially contaminated with freshly isolated pathogens. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità*, v. 27, n. 6, p. 789-798, 2015.
- PINHEIRO, J. B. **Correlação estrutura-propriedades de silicones para prótese facial - Efeitos da pigmentação e do envelhecimento**. 2012. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- PRATTEN, J. Physical disruption of oral biofilms by sodium bicarbonate: an *In vitro* study. **International Journal of Dental Hygiene**.v. 14, n 3, p. 20-214, 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.
- PUTTAIAH, R. et al. Evaluation of an automated dental unit water system's contamination control protocol. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2012.
- ROSSI-FEDELE, G. et al. Some factors influencing the stability of Sterilox[®], a super-oxidised water. **British Dental Journal**, v. 210, n. 12, 2011.
- SHAJAHAN, I. F. et al. 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.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 935 p.
- TUVO, B. et al. Prevention and Control of *Legionella* and *Pseudomonas* spp. Colonization in Dental Units. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 305, 2020.
- VASCONCELOS, G. L. L. Efeito de pastilhas higienizadoras efervescentes nos componentes da prótese parcial removível. 2017. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- WATANABE, E.; MONTEIRO, R. M.; SOUZA, F. B. Água na prática odontológica: desafios para um ambiente biologicamente seguro. In: SOUZA, F. B. **Biossegurança em odontologia: o essencial para a prática clínica**. Manole, 2021. p. 112-121.

APÊNDICE A – Valores da microdureza no corpo de prova de aço inoxidável antes da exposição aos produtos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Amostra	Leitura					Média
	Central	QSE	QIE	QID	QSD	
1	170	206	184	247	210	203,4
2	164	207	207	195	170	188,6
3	209	223	174	157	154	183,4
4	180	163	191	232	260	205,2
5	233	241	238	231	214	231,4
6	187	160	170	183	180	176,0
7	205	266	260	267	262	252,0
8	232	200	191	207	210	208,0
9	155	185	154	325	199	203,6
10	193	210	206	209	246	212,8
11	245	196	164	197	264	213,2
12	148	192	203	278	192	202,6
13	190	232	208	226	280	227,2
14	202	241	265	203	224	227,0
15	173	171	177	167	161	169,8
16	169	168	162	171	155	165,0
17	289	218	192	203	179	216,2
18	259	259	238	243	241	248,0
19	190	245	213	190	194	206,4
20	228	214	220	203	207	214,4
21	171	138	159	318	142	185,6
22	146	162	364	338	192	240,4
24	178	204	201	206	212	200,2
25	212	181	183	203	197	195,2
28	161	148	160	188	225	176,4
29	181	178	158	197	161	175,0
30	222	219	217	237	223	223,6
31	265	146	179	189	154	186,6
34	197	185	248	194	192	203,2
35	181	187	185	183	231	193,4
36	184	185	189	193	177	185,6
37	215	153	165	195	237	193,0
38	147	157	147	150	172	154,6
40	166	164	171	161	166	165,6

Legenda: QSE: quadrante superior esquerdo; QIE: quadrante inferior esquerdo; QID: quadrante inferior direito e QSD: quadrante superior direito.

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE B – Valores da dureza no corpo de prova de aço inoxidável. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Amostra	1 ano					Média
	Leitura					
	1	2	3	4	5	
1	186	160	199	197	179	184,2
2	185	217	217	202	176	199,4
3	177	186	139	231	220	190,6
4	158	174	189	275	329	225,0
5	196	225	187	233	254	219,0
6	252	251	251	223	277	250,8
7	207	226	241	147	272	218,6
8	240	189	189	184	238	208,0
9	161	229	173	155	359	215,4
10	192	210	274	207	219	220,4
11	263	178	224	149	347	232,2
12	145	215	222	310	400	258,4
13	174	175	199	195	299	208,4
14	202	234	226	199	202	212,6
15	171	146	147	168	177	161,8
16	164	166	162	166	169	165,4
17	295	149	192	192	193	204,2
18	296	251	217	257	265	257,2
19	216	172	195	191	208	196,4
20	225	186	201	198	274	216,8
21	174	161	176	185	164	172,0
22	161	177	192	182	182	178,8
24	190	235	198	189	303	223,0
25	222	166	204	214	237	208,6
28	161	134	182	215	250	188,4
29	172	207	163	152	210	180,8
30	226	182	203	204	205	204,0
31	220	165	182	156	172	179,0
34	198	170	205	225	242	208,0
35	172	141	175	295	219	200,4
36	180	171	162	196	177	177,2
37	181	135	179	169	173	167,4
38	148	125	147	157	286	172,6
40	180	157	168	168	164	167,4

Legenda: QSE: quadrante superior esquerdo; QIE: quadrante inferior esquerdo; QID: quadrante inferior direito e QSD: quadrante superior direito.

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE C – Valores da dureza no corpo de prova de aço inoxidável. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Amostra	2 anos					Média
	Leitura					
	1	2	3	4	5	
1	169	205	141	229	201	189,0
2	184	199	197	191	183	190,8
3	220	161	202	218	220	204,2
4	163	200	187	184	167	180,2
5	215	202	218	238	217	218,0
6	160	172	176	165	173	169,2
7	193	241	256	251	235	235,2
8	213	176	209	196	186	196,0
9	145	187	157	164	184	167,4
10	191	190	197	189	188	191,0
11	218	184	132	201	166	180,2
12	159	194	191	192	191	185,4
13	169	203	211	244	230	211,4
14	200	192	195	249	197	206,6
15	171	181	162	159	156	165,8
16	161	138	158	166	161	156,8
17	299	219	186	189	182	215,0
18	265	234	227	221	221	233,6
19	186	203	182	187	190	189,6
20	225	224	194	221	269	226,6
21	165	134	178	180	156	162,6
22	158	171	312	213	201	211,0
24	183	170	190	215	265	204,6
25	207	197	187	213	211	203,0
28	156	158	167	224	222	185,4
29	159	169	153	155	195	166,2
30	231	212	220	221	226	222,0
31	239	173	164	189	170	187,0
34	214	206	197	263	202	216,4
35	172	185	171	182	153	172,6
36	175	183	184	196	155	178,6
37	179	136	170	168	161	162,8
38	137	173	160	148	139	151,4
40	175	146	147	163	159	158,0

Legenda: QSE: quadrante superior esquerdo; QIE: quadrante inferior esquerdo; QID: quadrante inferior direito e QSD: quadrante superior direito.

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE D – Valores da corrosão no corpo de prova de aço inoxidável. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#		1	2	3	4	5	Média
Produto A	Potencial/tempo	-349	-349	-350	-344	-338	-346
	E(i=0)	-358,5	-357,7	-35,1	-351,1	-344	-289,28
	i corr.:	0,0121	0,0131	0,0148	0,0152	0,0194	0,01492
Produto B	Potencial/tempo	-171	-263	-159	-166	-186	-189
	E(i=0)	-300,4	-317,2	-273,3	-301,4	-264,7	-291,4
	i corr.:	0,6844	1,3764	0,6623	0,5782	1,1382	0,8879
Produto AB	Potencial/tempo	-100	30	-252	-294	-306	-184,4
	E(i=0)	-220,7	-350,1	-410,3	-443,2	-432,9	-371,44
	i corr.:	0,611	1,3866	0,2761	0,3228	0,4976	0,61882
Controle	Potencial/tempo	-40	-13	-5	-27	-14	-19,8
	E(i=0)	-381,2	-399,2	-250,5	-401,6	-59,9	-298,48
	i corr.:	7,8652	8,8057	7,3842	7,3669	0,5072	31,9292

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE E – Valores do ΔE no corpo de prova de poliuretana antes da exposição aos produtos na leitura de cor. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

tempo zero				
Amostra	1	2	3	média
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0
34	0	0	0	0
35	0	0	0	0
36	0	0	0	0
37	0	0	0	0
38	0	0	0	0
40	0	0	0	0

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE F – Valores do ΔE no corpo de prova de poliuretana com um ano de exposição aos produtos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

1 ano				
Amostra	1	2	3	média
1	2,23	2,23	2,23	2,23
2	1,45	1,47	1,49	1,47
3	1,76	1,78	1,79	1,78
4	2,04	1,99	2,00	2,01
5	0,79	0,84	0,86	0,83
6	1,73	1,65	1,64	1,67
7	0,36	0,35	0,34	0,35
8	1,06	1,10	1,10	1,09
9	0,18	0,22	0,30	0,23
10	1,40	1,35	1,33	1,36
11	2,10	2,11	2,13	2,11
12	1,19	1,23	1,23	1,22
13	1,59	1,41	1,14	1,38
14	2,25	2,26	2,26	2,26
15	3,25	3,25	3,24	3,25
16	2,69	2,68	2,68	2,68
17	1,51	1,50	1,51	1,51
18	5,37	5,33	5,33	5,34
19	1,74	1,76	1,76	1,75
20	0,20	0,22	0,27	0,23
21	3,51	4,00	3,88	3,80
22	3,88	4,45	4,25	4,19
24	2,41	2,53	2,54	2,49
25	1,67	1,74	1,59	1,67
28	3,68	3,72	3,65	3,68
29	3,29	3,32	3,26	3,29
30	1,54	1,66	1,58	1,59
31	3,53	3,52	3,52	3,52
34	1,02	1,09	0,95	1,02
35	3,09	3,09	3,09	3,09
36	1,11	1,11	0,87	1,03
37	2,50	2,53	2,44	2,49
38	3,42	3,41	3,37	3,40
40	2,04	2,04	2,05	2,04

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE G – Valores do ΔE no corpo de prova de poliuretana com dois anos de exposição aos produtos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

2 anos				
Amostra	1	2	3	média
1	3,51	3,49	3,49	3,50
2	4,55	4,55	4,54	4,55
3	5,38	5,38	5,38	5,38
4	0,20	0,13	0,15	0,16
5	4,42	4,41	4,41	4,41
6	1,24	1,22	1,18	1,21
7	2,09	2,06	2,07	2,07
8	2,17	2,19	2,19	2,18
9	4,13	4,12	4,12	4,12
10	0,93	0,89	0,80	0,87
11	2,58	2,56	2,56	2,57
12	5,51	5,51	5,50	5,51
13	3,15	3,09	3,00	3,08
14	5,46	5,46	5,45	5,46
15	7,36	7,36	7,35	7,36
16	3,54	3,53	3,53	3,53
17	2,29	2,29	2,28	2,29
18	3,70	3,70	3,70	3,70
19	2,86	2,85	2,85	2,85
20	3,53	3,53	3,49	3,52
21	3,92	3,92	3,91	3,92
22	6,78	6,78	6,75	6,77
24	3,66	3,62	3,61	3,63
25	1,71	1,70	1,67	1,69
28	1,47	1,47	1,34	1,43
29	3,09	3,15	3,11	3,12
30	4,64	4,62	4,62	4,63
31	7,54	7,51	7,51	7,52
34	1,11	1,12	1,10	1,11
35	7,23	7,23	7,22	7,23
36	4,34	4,33	4,31	4,33
37	4,57	4,57	4,56	4,57
38	4,11	4,11	4,10	4,11
40	2,36	2,30	2,32	2,33

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE H – Valores da dureza poliuretana antes da exposição dos produtos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Tempo zero						
Amostra	Leitura					Média
	1	2	3	4	5	
1	84,00	81,00	87,00	86,00	80,00	83,60
2	86,50	84,00	86,00	90,00	86,50	86,60
3	88,50	87,00	81,00	89,00	88,00	86,70
4	87,80	87,20	84,50	86,70	87,50	86,74
5	83,80	85,00	84,90	84,00	84,00	84,34
6	86,50	85,00	83,00	86,20	86,70	85,48
7	86,00	88,20	85,90	87,00	85,00	86,42
8	86,00	85,00	87,30	87,10	86,90	86,46
9	85,10	87,00	87,50	90,00	86,00	87,12
10	87,10	83,00	86,50	89,00	85,10	86,14
11	86,10	88,00	85,00	87,00	87,00	86,62
12	87,30	86,30	89,20	87,20	87,00	87,40
13	84,00	87,10	88,00	89,50	88,00	87,32
14	87,00	87,20	87,50	87,80	86,20	87,14
15	83,10	84,20	88,80	87,00	85,10	85,64
16	88,00	81,00	86,90	84,10	86,00	85,20
17	87,80	82,30	84,70	84,50	86,90	85,24
18	88,00	87,00	85,80	86,50	82,00	85,86
19	81,80	86,00	83,50	89,10	87,00	85,48
20	87,30	86,20	86,00	86,00	85,50	86,20
21	86,10	84,00	81,80	85,00	80,00	83,38
22	85,50	87,50	84,00	83,50	86,20	85,34
24	84,20	83,80	86,00	83,20	85,80	84,60
25	86,00	87,00	84,20	86,20	82,50	85,18
28	87,20	86,80	86,50	86,70	87,00	86,84
29	84,20	81,70	87,00	87,10	87,00	85,40
30	85,00	85,80	87,00	84,90	88,10	86,16
31	83,00	86,50	83,90	85,50	86,00	84,98
34	86,50	83,10	85,90	80,50	84,30	84,06
35	86,50	87,00	85,70	84,80	81,80	85,16
36	85,50	87,20	87,00	85,50	88,00	86,64
37	86,10	85,60	85,80	84,90	88,00	86,08
38	86,50	84,20	84,00	87,00	85,30	85,40
40	84,50	84,80	84,00	87,00	88,00	85,66

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE I – Valores da dureza poliuretana com um ano de exposição. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Amostra	1 ano					Média
	Leitura					
	1	2	3	4	5	
1	89,00	85,00	84,50	86,00	88,00	86,50
2	88,50	84,00	88,50	86,80	87,20	87,00
3	85,10	87,20	88,00	84,20	88,00	86,50
4	86,00	86,00	87,00	88,00	87,00	86,80
5	85,10	87,30	85,00	86,00	85,00	85,68
6	87,10	84,50	86,00	89,00	87,50	86,82
7	86,80	86,90	83,00	89,00	86,00	86,34
8	89,00	83,30	87,10	83,00	86,00	85,68
9	87,00	85,50	85,00	86,80	85,80	86,02
10	88,00	88,10	85,00	85,00	87,00	86,62
11	88,00	86,50	87,00	85,80	88,00	87,06
12	86,00	85,70	84,50	87,90	87,00	86,22
13	90,00	88,00	89,00	87,50	87,80	88,46
14	86,00	85,90	86,50	87,30	85,00	86,14
15	86,00	85,00	86,00	82,00	85,00	84,80
16	87,50	85,00	86,00	86,80	86,00	86,26
17	87,00	83,00	87,80	86,00	84,50	85,66
18	88,00	85,50	86,80	86,00	82,50	85,20
19	87,00	87,00	86,50	87,30	86,80	86,92
20	88,00	86,50	86,50	85,00	86,00	86,40
21	84,50	87,50	86,00	86,00	85,50	85,90
22	85,20	85,50	84,00	84,00	84,00	84,54
24	83,20	87,10	87,00	85,80	87,00	86,02
25	87,00	86,00	83,00	85,50	86,80	85,66
28	87,10	86,00	86,80	84,00	86,00	85,98
29	86,10	86,00	87,00	84,10	85,50	85,74
30	86,00	83,50	85,00	84,00	82,00	84,10
31	84,80	85,50	83,10	84,00	85,00	84,48
34	83,00	86,00	85,00	84,20	86,80	85,00
35	85,00	86,00	84,20	83,00	85,00	84,64
36	87,00	87,00	85,50	87,00	83,00	85,90
37	87,00	85,80	86,80	85,80	86,00	86,28
38	84,00	82,50	83,50	87,00	81,00	83,60
40	84,10	84,00	82,10	83,20	85,00	83,68

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE J – Valores da dureza poliuretana com dois anos de exposição. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Amostra	2 anos					Média
	Leitura					
	1	2	3	4	5	
1	84,00	87,00	87,20	86,70	88,00	86,58
2	87,10	87,30	85,00	88,00	87,20	86,92
3	88,10	85,00	88,30	88,20	88,00	87,52
4	85,80	87,80	87,00	86,50	86,50	86,72
5	87,80	83,50	84,00	85,60	82,00	84,58
6	86,20	87,10	83,20	84,90	85,20	85,32
7	88,80	88,10	84,90	86,50	88,00	87,26
8	84,90	84,00	83,20	87,10	81,70	84,18
9	86,00	83,50	86,90	86,00	86,50	85,78
10	85,00	84,00	88,90	86,00	87,20	86,22
11	86,50	86,90	86,00	87,00	84,10	86,10
12	87,10	85,80	88,00	87,00	86,00	86,78
13	88,80	86,80	87,70	85,90	86,50	87,14
14	85,90	87,80	86,80	86,20	85,90	86,52
15	84,90	84,00	82,10	83,50	84,90	83,88
16	86,50	84,00	83,20	85,90	84,30	84,78
17	87,50	86,00	86,10	87,00	85,00	86,32
18	87,80	84,80	84,30	87,50	86,50	86,18
19	87,00	87,80	85,90	86,20	85,00	86,38
20	84,90	86,10	85,10	84,80	86,80	85,54
21	81,10	88,00	81,20	86,30	86,00	84,52
22	85,00	86,00	84,80	81,50	84,90	84,44
24	86,70	86,00	83,00	87,20	85,50	85,68
25	86,00	84,80	87,50	84,50	83,00	85,16
28	87,30	83,00	86,00	85,50	84,50	85,26
29	86,50	87,00	86,00	84,80	81,50	85,16
30	83,00	86,50	85,30	84,10	85,00	84,78
31	85,00	86,00	83,20	82,70	83,50	84,08
34	86,00	81,90	86,50	85,80	84,80	85,00
35	94,30	85,00	83,00	86,00	84,00	86,46
36	83,50	86,80	85,10	86,80	85,00	85,44
37	87,50	86,00	82,00	87,20	86,00	85,74
38	83,50	85,80	83,50	85,00	84,10	84,38
40	84,20	83,00	80,90	86,80	83,80	83,74

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE K – Valores da rugosidade poliuretana antes da exposição dos produtos. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

Amostra	T0	1 ano	2 anos
1	0,291	0,182	0,273
2	0,221	0,239	0,325
3	0,206	0,223	0,179
4	0,200	0,188	0,261
5	0,192	0,202	0,273
6	0,186	0,204	0,275
7	0,595	0,202	0,207
8	0,252	0,258	0,247
9	0,259	0,256	0,223
10	0,201	0,237	0,371
11	0,164	0,100	0,270
12	0,190	0,215	0,203
13	0,354	0,172	0,290
14	0,189	0,249	0,230
15	0,382	0,219	0,226
16	0,227	0,200	0,249
17	0,230	0,279	0,231
18	0,451	0,366	0,290
19	0,449	0,387	0,336
20	0,346	0,351	0,403
21	0,553	0,409	0,203
22	0,188	0,216	0,384
24	0,258	0,326	0,335
25	0,222	0,220	0,231
28	0,139	0,261	0,495
29	0,240	0,248	0,202
30	0,323	0,186	0,489
31	0,219	0,330	0,531
34	0,204	0,179	0,274
35	0,251	0,178	0,530
36	0,220	0,199	0,450
37	0,158	0,137	0,223
38	0,365	0,327	0,282
40	0,295	0,197	0,229

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE L – Avaliação *in vitro* da quantificação da biomassa total dos produtos individual e do protocolo de aplicação (*Escherichia coli*). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#	Controle	Produto A	Produto B	Produto AB	Protocolo
1	0,45	0,28	0,35	0,38	0,38
2	1,14	0,34	0,45	0,40	0,37
3	0,40	0,35	0,40	0,59	0,34
4	0,53	0,32	0,46	0,43	0,40
5	0,52	0,24	0,33	0,31	0,30
6	0,43	0,34	0,47	0,40	0,33
7	0,36	0,37	0,36	0,32	0,35
8	0,52	0,31	0,45	0,42	0,29
Média	0,54	0,32	0,41	0,41	0,34

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE M – Avaliação *in vitro* da quantificação da biomassa total dos produtos individual e do protocolo de aplicação (*Pseudomonas aeruginosa*). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#	Controle	Produto A	Produto B	Produto AB	Protocolo
1	3,85	0,68	4,93	3,05	6,00
2	6,00	1,25	5,00	3,52	6,00
3	4,96	2,65	4,93	2,79	3,97
4	3,94	3,16	3,85	2,98	4,93
5	4,93	2,93	3,78	3,04	4,98
6	4,98	2,91	3,32	1,64	6,00
7	3,95	2,96	6,00	3,13	4,99
8	4,96	3,47	3,49	3,11	3,97
Média	4,70	2,50	4,41	2,91	5,11

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE N – Avaliação *in vitro* da quantificação da biomassa total dos produtos individual e do protocolo de aplicação (*Staphylococcus aureus*). Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#	Controle	Produto A	Produto B	Produto AB	Protocolo
1	1,87	1,16	0,49	0,58	0,42
2	0,76	1,11	0,68	0,73	0,71
3	0,78	0,55	0,56	1,05	0,43
4	1,22	1,15	0,73	1,00	0,73
5	0,58	1,37	0,51	0,65	0,43
6	0,83	1,31	0,67	1,24	0,70
7	0,83	1,60	0,86	0,71	0,77
8	0,72	0,78	0,44	0,58	0,80
Média	0,95	1,13	0,62	0,82	0,62

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE O – Avaliação *in vitro* da atividade metabólica de *Escherichia coli*. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#	Controle	Produto A	Produto B	Produto AB	Protocolo
1	0,23	0,03	0,01	0,01	0,00
2	0,27	0,01	0,01	0,00	0,01
3	0,23	0,01	0,01	0,00	0,00
4	0,19	0,01	0,01	0,00	0,00
5	0,25	0,01	0,01	0,00	0,00
6	0,26	0,00	0,01	0,00	0,00
7	0,17	0,01	0,01	0,00	0,01
8	0,17	0,01	0,00	0,01	0,00
9	0,22	0,02	0,04	0,05	0,00
Média	0,22	0,01	0,01	0,01	0,00

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE P – Avaliação *in vitro* da atividade metabólica de *Pseudomonas aeruginosa*. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#	Controle	Produto A	Produto B	Produto AB	Protocolo
1	1,32	0,04	0,48	0,02	0,09
2	1,30	0,06	0,15	0,07	0,10
3	1,48	0,06	0,26	0,02	0,05
4	0,73	0,04	0,20	0,02	0,07
5	0,57	0,17	0,20	0,05	0,06
6	1,34	0,13	0,18	0,07	0,06
7	1,66	0,07	0,14	0,06	0,14
8	1,62	0,01	0,15	0,01	0,04
9	0,67	0,02	0,00	0,00	0,00
Média	1,19	0,07	0,20	0,04	0,07

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE Q – Avaliação *in vitro* da atividade metabólica de *Staphylococcus aureus*. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

#	Controle	Produto A	Produto B	Produto AB	Protocolo
1	1,42	0,02	0,22	0,02	0,00
2	2,19	0,00	0,21	0,01	0,00
3	1,89	0,00	0,22	0,09	0,01
4	1,71	0,00	0,22	0,03	0,00
5	2,11	0,03	0,24	0,02	0,00
6	2,26	0,00	0,25	0,01	0,01
7	1,69	0,00	0,25	0,03	0,00
8	1,59	0,02	0,22	0,01	0,00
9	1,86	0,12	0,16	0,06	0,00
Média	1,86	0,02	0,22	0,03	0,00

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE U – Avaliação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser com o produto A. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
550936,18	228908,81	779844,99	577792,48	558162,31	1135954,79	1444599,20	1607855,34	3052454,54
848360,49	770069,13	1618429,62	346373,15	317832,96	664206,11	1173528,07	1290440,14	2463968,21
550936,18	228908,81	779844,99	355006,96	314947,84	669954,79	767346,21	836975,57	1604321,78
1536619,34	1392699,88	2929319,21	412577,91	388787,29	801365,20	727276,93	795758,42	1523035,35
487254,87	226110,36	713365,23	434672,33	437056,07	871728,40	641234,79	701296,87	1342531,66
1749119,38	1829134,44	3578253,81	365234,08	359655,91	724889,98	697477,40	782533,97	1480011,38
696795,46	643616,36	1340411,82	329406,99	324981,99	654388,98	746756,12	888501,27	1635257,39
594324,12	409665,83	1003989,95	329173,52	316564,03	645737,54	809761,96	920730,90	1730492,86
967992,04	838852,37	1806844,41	339262,63	358792,01	698054,64	697015,62	790641,65	1487657,27
290143,27	218328,52	508471,79	298327,69	289431,56	587759,26	650676,77	747501,77	1398178,53
523034,49	329927,83	852962,32	497725,47	523412,11	1021137,59	744642,73	850104,44	1594747,17
2158065,82	1935784,96	4093850,77	888167,03	950109,72	1838276,75	547913,91	632463,30	1180377,21
136616,46	145819,49	282435,95	366910,15	340859,29	707769,43	848847,48	956884,30	1805731,78
470420,69	228559,34	698980,03	534930,04	536521,04	1071451,08	590479,97	675500,46	1265980,43
1262967,28	1099033,96	2362001,23	439886,11	466209,66	906095,78	747958,91	838356,41	1586315,31
208365,92	103179,42	311545,34	544140,17	462736,78	1006876,94	489386,05	511703,90	1001089,95
1639744,90	1234956,93	2874701,83	267129,12	223490,26	490619,38	786936,43	822371,79	1609308,22
344196,79	218836,23	563033,03	281515,07	233660,06	515175,13	541851,86	575661,24	1117513,10
1845118,47	1507347,55	3352466,01	347073,20	314122,98	661196,18	1185232,55	1227922,34	2413154,88
1892531,90	1522631,83	3415163,74	435472,03	373814,84	809286,86	615067,88	657595,09	1272662,97
1899566,88	1331886,28	3231453,16	397823,14	325288,98	723112,12	833135,34	962301,81	1795437,16
833890,26	476705,24	1310595,50	284376,20	268439,30	552815,50	743423,45	1102457,87	1845881,32
1360514,07	1245530,30	2606044,36	387828,39	346671,48	734499,87	560165,81	589254,46	1149420,27
1649569,58	1835562,53	3485132,11	369418,12	284685,63	654103,75	881556,11	921628,33	1803184,44
1867941,87	1706834,54	3574776,40	661474,80	519303,72	1180778,52	626149,03	668472,93	1294621,96
1641924,64	1387576,90	3029501,54	679126,19	591372,38	1270498,57	599001,18	630875,95	1229877,14
1518934,25	1437977,86	2956912,11	529168,53	453453,78	982622,31	641591,38	691800,36	1333391,74
1941276,22	1621787,69	3563063,91	328538,84	277329,71	605868,54	675486,39	698100,29	1373586,68
1787963,78	1660554,20	3448517,98	474032,63	413810,83	887843,46	746803,73	788896,33	1535700,06
995991,11	586209,35	1582200,46	676344,47	595319,74	1271664,21	1288480,46	1499743,64	2788224,10
790661,23	643310,51	1433971,74	464969,05	447304,88	912273,93	1209745,18	1083630,05	2293375,24
2297789,95	1838811,42	4136601,37	318386,45	304090,23	622476,68	1065939,48	947261,62	2013201,10
172375,23	63806,72	236181,95	362001,61	344901,39	706903,00	764283,53	685934,74	1450218,27
916274,42	832192,12	1748466,54	415833,04	458600,22	874433,26	141578,32	81334,78	222913,10
2025064,57	1347620,64	3372685,20	446314,42	442066,75	888381,17	886214,02	816868,64	1703082,66
1240945,99	1016486,79	2257432,78	394966,57	352879,81	747846,38	536432,14	497222,23	1033654,37
789252,95	679538,37	1468791,31	627190,54	622297,55	1249488,08	818878,21	728956,25	1547834,46
1568101,23	1258211,71	2826312,94	483033,21	501238,01	984271,22	812789,39	695306,08	1508095,48
1234195,59	976327,47	2210523,06	343521,99	370888,37	714410,36	116052,01	105085,14	221137,15
1175094,83	897614,05	2072708,88	419727,88	392251,17	811979,04	782057,48	714223,39	1496280,87
1961813,77	1612990,94	3574804,72	576633,83	644500,43	1221134,26	550755,18	519234,73	1069989,91
859273,96	764598,41	1623872,37	443668,42	502140,24	945808,66	817073,67	774988,42	1592062,09
1050084,74	937996,07	1988080,81	603679,21	671743,04	1275422,25	861500,70	784578,74	1646079,44
862507,22	756977,00	1619484,22	352264,83	389421,59	741686,41	149301,04	139249,70	288550,74
1316412,44	667654,02	1984066,46	322465,37	398963,53	721428,90	1450553,74	1650810,11	3101363,86

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE V – Avaliação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser com o produto B. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
2095693,26	2564574,56	4660267,81	7557119,79	532263,67	8089383,46	837964,53	483927,58	1321892,11
841524,06	1239172,73	2080696,79	7673586,16	669685,39	8343271,55	880288,85	460853,13	1341141,98
2216972,82	2693242,38	4910215,19	626877,33	68304,06	695181,39	1045356,80	680957,36	1726314,16
1146698,26	1720421,62	2867119,88	683132,33	69259,82	752392,15	1602868,40	1326317,04	2929185,44
915897,84	1241975,75	2157873,59	8770316,41	606918,85	9377235,26	1173627,78	772426,75	1946054,53
1839598,12	2447008,55	4286606,67	8084883,74	562155,71	8647039,45	745003,16	327581,14	1072584,30
1695452,40	2064517,16	3759969,56	6495175,93	543789,38	7038965,31	761950,53	352238,09	1114188,62
1718512,74	2183376,46	3901889,20	5097707,75	381088,68	5478796,43	880182,79	511225,92	1391408,71
1649365,70	2123183,94	3772549,65	605550,86	63510,36	669061,22	833092,68	324860,35	1157953,03
2504455,23	2910207,97	5414663,20	1043232,69	97805,57	1141038,26	1554123,36	777312,85	2331436,21
2279324,48	2829457,20	5108781,68	7675061,24	544347,93	8219409,17	766661,86	278851,11	1045512,97
803049,99	1025045,58	1828095,57	795579,51	72674,99	868254,50	751830,90	305768,41	1057599,31
1810896,28	2453092,10	4263988,38	769632,60	74828,94	844461,54	635860,86	338190,15	974051,01
1307771,09	1832797,11	3140568,20	1254671,33	88577,45	1343248,78	629397,61	293200,87	922598,48
1864035,29	2384472,86	4248508,15	808669,73	69094,71	877764,44	715248,50	257262,41	972510,91
183161,75	106961,19	290122,94	1850530,26	181452,00	2031982,26	940694,17	1422097,77	2362791,94
2019739,63	2412226,09	4431965,72	4426472,25	517212,71	4943684,96	706319,33	1143794,97	1850114,30
1294860,70	1510180,41	2805041,11	3274289,04	344921,13	3619210,17	627968,90	969705,21	1597674,11
2059956,99	2335191,81	4395148,80	4009924,85	450316,26	4460241,11	1104032,06	1941544,44	3045576,50
733571,86	744129,58	1477701,44	4178842,76	493551,02	4672393,78	459470,05	659786,90	1119256,95
824252,46	1044824,74	1869077,20	1416004,58	159397,13	1575401,71	443153,26	679019,24	1122172,50
706934,63	578237,93	1285172,56	6939940,54	671808,88	7611749,42	772781,98	1179734,62	1952516,60
934291,91	727491,98	1661783,89	6290806,59	587734,79	6878541,38	911078,77	1206500,96	2117579,73
352362,41	398368,92	750731,33	1844059,75	271897,38	2115957,13	421152,23	319823,14	740975,37
289794,12	183036,91	472831,03	7644584,60	644173,99	8288758,59	1020824,80	1558440,97	2579265,77
263870,22	266348,09	530218,31	8965205,00	816155,19	9781360,19	456823,79	659190,46	1116014,25
306042,96	268424,26	574467,22	9907515,65	908097,06	10815612,71	405013,18	631584,82	1036598,00
167361,93	103047,07	270409,00	6057296,44	621925,29	6679221,73	558717,54	519664,97	1078382,51
670834,43	596924,59	1267759,02	2182605,00	188486,79	2371091,79	702120,25	972877,75	1674998,00
1852555,54	1818798,16	3671353,71	6402680,90	594282,80	6996963,70	576614,65	647409,11	1224023,76
1393463,10	1161932,85	2555395,95	1648942,45	325111,03	1974053,48	1623714,08	1068034,76	2691748,84
2729744,44	2240724,05	4970468,49	2900830,43	410232,19	3311062,62	1258549,89	694191,82	1952741,71
2453325,96	2016976,00	4470301,96	3021995,40	346212,63	3368208,03	1832196,57	1256203,89	3088400,46
1103143,43	967932,95	2071076,39	2116253,01	336781,44	2453034,45	1302315,32	674598,14	1976913,46
1430087,65	1179745,29	2609832,95	933354,79	138244,81	1071599,60	1460913,31	868985,67	2329898,98
1437871,83	1311342,63	2749214,46	5853139,50	562676,90	6415816,40	1394148,09	775296,51	2169444,60
2043278,14	1939464,19	3982742,33	1115450,35	369181,38	1484631,73	1156238,09	429954,01	1586192,10
1769522,25	1415111,78	3184634,02	2178087,30	536716,85	2714804,15	1479160,67	708655,93	2187816,60
1219401,32	1170925,32	2390326,64	2352162,47	396865,66	2749028,13	1872061,83	1466573,14	3338634,97
573609,70	649317,76	1222927,46	1247866,94	402986,87	1650853,81	1363495,10	680123,39	2043618,49
1264427,42	1173916,08	2438343,50	4105166,24	475224,51	4580390,75	1821420,28	1312097,67	3133517,95
1496922,84	1468118,70	2965041,55	1461380,02	205297,80	1666677,82	1666688,79	1210365,13	2877053,92
1989403,30	1918940,86	3908344,16	1102253,45	836083,31	1938336,76	1342062,15	813478,96	2155541,12
2607357,30	2808565,54	5415922,84	814683,78	892390,24	1707074,02	1187079,35	532729,85	1719809,20
656021,13	972495,62	1628516,75	448507,96	139219,08	587727,03	1242117,23	778647,09	2020764,32

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE W – Avaliação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser com o produto AB. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
2941150,31	6135595,03	9076745,34	6611996,25	1053241,43	7665237,68	1184967,31	1210931,55	2395898,86
3259787,54	7776955,87	11036743,42	7737263,25	983552,71	8720815,96	2547855,53	1431313,14	3979168,67
5277060,28	12969471,17	18246531,45	6432177,84	862273,51	7294451,35	3534136,20	1886463,73	5420599,93
2914655,57	6850630,96	9765286,53	5440457,67	798421,46	6238879,13	668418,97	363957,80	1032376,77
4042098,03	8824223,45	12866321,48	8335386,39	1086583,27	9421969,66	827577,56	612207,13	1439784,69
4196293,84	9506867,73	13703161,57	8399320,21	1359866,46	9759186,67	1574368,36	925651,90	2500020,26
3165371,45	7022417,20	10187788,66	6136093,80	760418,84	6896512,64	1104557,58	692630,67	1797188,25
1713793,84	2832728,66	4546522,50	5381118,42	883500,01	6264618,43	493362,77	268198,88	761561,65
2896887,45	5904825,67	8801713,12	8010385,69	1093741,04	9104126,73	2623439,17	1355292,74	3978731,90
2544608,98	5149410,15	7694019,13	5772765,73	915824,09	6688589,82	3345087,38	1772632,81	5117720,19
1626590,31	2931623,52	4558213,83	6867089,40	924815,28	7791904,68	1499850,13	921868,92	2421719,05
1392410,34	1957228,48	3349638,82	5402620,59	1045595,04	6448215,63	2254662,59	1215983,03	3470645,62
3069867,56	6554857,32	9624724,88	5120334,74	716648,80	5836983,54	796689,78	504772,35	1301462,13
2807838,64	6102670,25	8910508,89	4319095,44	795776,06	5114871,50	776229,93	517486,48	1293716,41
955055,24	1170611,51	2125666,75	4908095,27	852004,62	5760099,89		487451,65	487451,65
1392124,32	2008910,06	3401034,38	5069002,07	3720089,94	8789092,01	1175637,36	668266,75	1843904,11
1244206,63	1781523,40	3025730,03	1973741,63	1532701,55	3506443,18	1363464,19	560810,35	1924274,54
1189410,90	1673566,18	2862977,08	7020973,62	4043699,03	11064672,65	1358118,63	1586467,70	2944586,33
1260949,51	1994926,00	3255875,51	1423592,85	452126,35	1875719,20	1489023,46	426936,61	1915960,07
1527636,23	2044797,01	3572433,24	5249848,23	4421514,49	9671362,72	1056967,94	341368,25	1398336,19
1800374,37	2623931,89	4424306,25	6985669,82	4718684,33	11704354,15	839979,74	562473,71	1402453,45
1283653,85	1727223,63	3010877,48	917669,94	443277,68	1360947,62	1274075,62	383000,92	1657076,54
1562063,41	2102897,70	3664961,11	5110343,26	3635124,46	8745467,72	1004898,88	1302058,66	2306957,54
925275,08	1233423,60	2158698,68	4657916,59	2911805,53	7569722,12	2849322,89	1536414,87	4385737,76
1471032,22	2098487,15	3569519,37	3632640,00	2498445,19	6131085,19	3494041,26	1050323,10	4544364,36
1440680,52	1679109,02	3119789,54	5720189,02	3654704,48	9374893,50	2105813,88	376939,50	2482753,38
1381365,53	1540047,89	2921413,42	4350238,63	2790754,80	7140993,43	869558,82	357082,95	1226641,77
1585588,15	2873261,69	4458849,84	5360836,48	929980,47	6290816,95	805605,28	1796715,82	2602321,10
1553896,44	2346921,09	3900817,54	4350742,13	738067,83	5088809,96	3862565,56	133669,82	3996235,38
949323,74	1107240,11	2056563,84	8215135,82	2227135,85	10442271,67	344864,71		344864,71
1186004,92	1927151,24	3113156,16	9831782,67	8833365,70	18665148,37	829027,69	417596,58	1246624,27
1254570,27	2486121,19	3740691,45	8492819,00	7110112,31	15602931,31	2083348,98	1119237,74	3202586,72
961821,18	1504412,38	2466233,56	1288843,80	1215802,36	2504646,16	1497744,52	791070,96	2288815,48
747769,91	1266401,27	2014171,18	5496905,05	2906720,63	8403625,68	566692,47	254084,23	820776,70
4792226,54	10526219,89	15318446,43	1640909,13	1683872,92	3324782,05	860718,37	476508,06	1337226,43
877450,65	1386075,42	2263526,07	7646993,34	6129331,69	13776325,03	884340,92	813579,95	1697920,87
970778,21	1684906,26	2655684,48	4499712,57	2743649,09	7243361,66	748229,43	355291,57	1103521,00
1330574,48	2070582,34	3401156,82	8307688,00	7355496,71	15663184,71	987955,16	579186,72	1567141,88
1740856,67	3271315,48	5012172,15	4633803,47	2683975,20	7317778,67	697289,96	327227,01	1024516,97
926843,53	1558138,23	2484981,76	1142103,89	964009,55	2106113,44	866154,62	414653,60	1280808,22
1598229,69	1861142,24	3459371,92	11302338,19	6284995,05	17587333,24	683000,96	310632,88	993633,84
1535959,26	1793539,57	3329498,83	6540556,82	3571366,60	10111923,42	2835740,37	1377549,78	4213290,15
1391446,06	2091121,82	3482567,89	7679059,96	1835004,28	9514064,24	727805,65	347825,89	1075631,54
850331,87	1105740,20	1956072,07	7474901,79	2776726,53	10251628,32	535670,02	249827,24	785497,26
1084479,02	1444028,10	2528507,12	6373719,40	2273216,10	8646935,50	789167,40	361962,67	1151130,07

Fonte: elaborada pela autora.

919019,27	755789,41	1674808,68	7315627,81	5887141,99	13202769,80	2152514,49	1198489,91	3351004,40
1740579,88	1355097,43	3095677,31	7442131,62	4506670,26	11948801,88	1667659,99	934945,73	2602605,72
1786415,86	1148672,27	2935088,13	9477022,18	7462000,52	16939022,70	1072390,08	496839,91	1569229,99
990121,66	739430,24	1729551,90	9561747,60	7510488,72	17072236,32	1051816,71	617582,37	1669399,08
1995244,20	1181943,37	3177187,57	9080723,24	7101828,81	16182552,05	1657471,04	906567,99	2564039,03
848507,94	633195,54	1481703,48	8112835,30	5635556,93	13748392,23	1221039,46	643677,46	1864716,92
772200,67	627352,64	1399553,31	6658120,93	4999866,93	11657987,86	1416185,45	660898,55	2077084,00
1522217,61	1163212,12	2685429,73	11071770,40	5639520,20	16711290,60	1130942,39	591830,04	1722772,43
997456,42	817222,08	1814678,50	10740750,29	5176589,10	15917339,39	933120,51	503726,88	1436847,39
630028,00	545091,54	1175119,54	5498565,82	3653360,83	9151926,65	1058199,94	621063,67	1679263,61

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE Y – Avaliação da viabilidade das células bacterianas no biofilme por microscopia confocal de varredura à laser com o controle. Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total	Vivas	Mortas	Total
5753373,17	5822710,03	11576083,20	16851300,30	7374672,22	24225972,52	6832701,27	1031306,94	7864008,21
8171424,69	7717161,62	15888586,31	4796467,30	2207240,48	7003707,78	5274997,78	781878,85	6056876,63
669533,36	1151198,04	1820731,40	19334472,50	12568409,38	31902881,88	6185914,18	867580,40	7053494,58
6157489,77	7861667,57	14019157,34	13660746,70	7383440,69	21044187,39	3464776,76	384247,08	3849023,84
7873674,69	7522595,15	15396269,84	21383406,10	10550316,39	31933722,49	6325381,60	1004982,38	7330363,98
6414901,38	6265944,46	12680845,84	28632447,80	15653366,36	44285814,16	6008205,01	1012316,09	7020521,10
4449238,13	7163655,56	11612893,69	41373269,10	21732512,43	63105781,53	6469756,89	887086,78	7356843,67
7545818,94	6533120,89	14078939,83	30463041,00	15978731,73	46441772,73	6713006,42	984296,28	7697302,70
8123325,17	7672859,69	15796184,86	4829531,60	3271796,80	8101328,40	6205221,10	1094088,67	7299309,77
11222307,83	9748691,26	20970999,09	5232143,40	4607339,82	9839483,22	6708638,22	1031491,21	7740129,43
7268453,92	6037531,36	13305985,28	5231514,80	4731355,77	9962870,57	3414987,16	636877,59	4051864,75
9897019,72	5484325,53	15381345,25	4585188,55	3241315,76	7826504,31	2516855,80	488936,24	3005792,04
9874818,61	10290904,76	20165723,37	4753494,10	2860072,38	7613566,48	6532170,78	885182,63	7417353,41
8548823,62	7049719,03	15598542,65	5167243,30	5132661,59	10299904,89	5467623,79	833642,10	6301265,89
7955704,49	5935550,70	13891255,19	6230171,00	5824751,36	12054922,36	7459198,49	1269812,16	8729010,65
6178174,21	6154743,42	12332917,63	7040212,30	3752853,17	10793065,47	4578363,28	835896,77	5414260,05
5663903,24	6395947,13	12059850,37	5195493,10	4018679,88	9214172,98	3698807,46	471166,53	4169973,99
5616682,38	6182919,36	11799601,74	19155397,90	15244813,67	34400211,57	3981487,04	534077,34	4515564,38
7045625,63	7812096,18	14857721,81	35044921,20	22667889,59	57712810,79	2892076,30	513777,92	3405854,22
6641659,43	6722192,43	13363851,86	9315028,30	6850320,89	16165349,19	5405663,68	772495,09	6178158,77
7490492,83	6800646,79	14291139,62				3788425,21	663858,86	4452284,07
5003059,04	5571686,18	10574745,22				4710067,92	724515,09	5434583,01
5439061,86	5710000,49	11149062,35				5382568,20	814725,87	6197294,07
7226224,73	6371010,52	13597235,25				4738486,17	778547,93	5517034,10
11332183,62	5948939,13	17281122,75				6786651,93	944285,38	7730937,31
6121963,53	6076126,45	12198089,98				3412717,54	582636,88	3995354,42
6654330,78	6409951,97	13064282,75				2637845,55	473261,87	3111107,42
7129829,16	7454291,05	14584120,21				3523376,62	497614,63	4020991,25
6210036,94	6661076,11	12871113,05				3443738,05	538173,28	3981911,33
5447260,94	5953526,82	11400787,76				3962284,88	574978,12	4537263,00
1328669,61	4427161,68	5755831,29				6184280,78	843505,17	7027785,95
1800828,93	6213685,19	8014514,12				4069739,43	495363,82	4565103,25
1418053,22	5217969,30	6636022,52				3403330,77	356309,13	3759639,90
904865,15	3330441,62	4235306,77				3150748,90	370984,41	3521733,31
1288742,17	4116484,99	5405227,16				5102383,95	770203,31	5872587,26
1483436,99	4595129,83	6078566,82				5011348,60	770847,35	5782195,95
1095783,35	3953068,83	5048852,18				5931544,67	714722,02	6646266,69
1452256,68	5094618,19	6546874,87				5580791,30	711581,66	6292372,96
1380904,79	3832036,96	5212941,75				4195121,81	697575,95	4892697,76
1340515,71	4138781,04	5479296,75				5076348,10	685877,21	5762225,31
1183839,85	3473451,05	4657290,90				3959708,45	663507,86	4623216,31
1204587,97	3528793,18	4733381,15				4619953,53	726922,63	5346876,16
1653627,83	6413918,17	8067546,00				4427264,32	502300,73	4929565,05
1533161,35	5656678,55	7189839,90				3666957,84	445476,94	4112434,78
5144801,02	15221371,92	20366172,94				5415071,67	846336,28	6261407,95
6677942,10	9172315,52	15850257,62				7577861,81	954163,54	8532025,35
5019476,11	7562307,61	12581783,72				1170842,85	114914,56	1285757,41
7681491,98	9336468,98	17017960,96				2615823,81	315737,83	2931561,64
6045800,31	7152786,38	13198586,69				3477496,47	358440,99	3835937,46
8464335,27	10883830,81	19348166,08				6172360,34	740173,70	6912534,04

7970028,90	9355476,13	17325505,03				3530139,33	508875,56	4039014,89
6665512,73	6825711,70	13491224,43				4970299,86	588416,62	5558716,48
7978037,27	5814978,28	13793015,55				6777984,73	824388,39	7602373,12
9360707,47	10216198,59	19576906,06				4415061,59	524922,89	4939984,48
8237851,39	10066859,86	18304711,25				6444385,67	830991,31	7275376,98
8863879,06	9573837,65	18437716,71				5061101,29	687999,53	5749100,82
10093255,86	9244962,50	19338218,36				7451750,87	909117,81	8360868,68
8128561,70	8321157,36	16449719,06				4586569,99	543510,15	5130080,14
962965,91	1310448,78	2273414,69				4512705,22	532092,88	5044798,10
7470218,94	8911848,49	16382067,43				6907798,23	830965,53	7738763,76

Fonte: elaborada pela autora.