

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME EM CANETAS  
ODONTOLÓGICAS E EFICIÊNCIA DE DIFERENTES  
TRATAMENTOS NA SUA REMOÇÃO**

VALDIONIR DA ROSA FREITAS

Março de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME EM CANETAS  
ODONTOLÓGICAS E EFICIÊNCIA DE DIFERENTES  
TRATAMENTOS NA SUA REMOÇÃO**

Valdionir da Rosa Freitas  
Biomédico – FEEVALE

Dissertação apresentada como  
um dos requisitos para a obtenção do  
Grau de Mestre em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil  
Março de 2010

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

F866p Freitas, Valdionir da Rosa

Produção in vitro de biofilme em canetas odontológicas e eficiência de tratamentos na sua remoção / Valdionir da Rosa Freitas . – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Amauri Braga Simonetti

1. Biofilmes 2. Pseudomonas aeruginosa 3. Staphylococcus aureus 4. Biocidas 5. Instrumentos odontológicos I. Simonetti, Amauri Braga, orient.  
II. Título.

CDU 579.8 (043)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Amauri Braga Simonetti pela orientação, sabedoria e a amizade consagrada ao longo deste percurso.

A minha filha Lauren Freitas pela compreensão da ausência em alguns momentos.

A minha família pelo apoio e força durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 164 e 209 em especial a Sabrina Salamoni e a Michele Mann pelo apoio inestimável a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório do 159 em especial à Leila e à Roberta pela grande contribuição ao trabalho e agradável convivência.

Aos colegas no ICBS Rebeca Inhoque, Aline Weber, André Roman, Adriane Zimmer, Ana Cassenego , Francielle Bücken, Fabíola Schultz, Luciana Senter, pelo apoio, amizade e espontaneidade.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela contribuição em minha formação.

Ao Tribunal de Contas do Rio Grande do Sul pelo apoio direto na viabilização desse trabalho.

Aos colegas do Tribunal de Contas em especial a Eva Semensato, ao José Candido, a Vera Elisa, ao Luis Carlos , a Elsi Tim e ao Charles Ribeiro pelo forte empenho na realização deste trabalho e a todos outros colegas que também contribuíram nesta etapa e também a compreensão dos colegas do CPM-TCE-rs pela minha ausência durante o período.

E agradeço a todos aqueles que de alguma forma foram generosos ao apoiar e acreditar na realização do trabalho.

# PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME EM CANETAS ODONTOLÓGICAS E EFICIÊNCIA DE DIFERENTES TRATAMENTOS NA SUA REMOÇÃO<sup>1</sup>

Autor: Valdionir da Rosa Freitas  
Orientador: Amauri Braga Simonetti

## Resumo

Em consultórios odontológicos são utilizadas canetas rotatórias que durante seu uso entram em contato com a microbiota oral, podendo trazer conseqüências para o próprio paciente ou para outros que utilizarem o mesmo equipamento, se não houver um tratamento apropriado para sua reutilização. Para avaliar a eficiência de diferentes tratamentos utilizados rotineiramente na limpeza e desinfecção de equipamentos odontológicos, este trabalho descreve a produção de biofilme *in vitro* em superfície de canetas odontológicas e a eficiência dos biocidas glutaraldeído, ácido peracético e álcool 70%, do detergente enzimático e da lavagem ultra-sônica para remoção do biofilme induzido, utilizando amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Para a padronização dos métodos, além de curvas de crescimento de ambos os micro-organismos, foram realizados testes de adesão em cupons obtidos pelo corte das canetas. Foram testados diferentes tempos de incubação para a produção do biofilme, cujo valor máximo foi obtido em 14 dias. A avaliação da formação de biofilme foi realizada pelo método de contagem de bactérias viáveis (CBV), por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo método Cristal Violeta. A eficiência dos tratamentos na remoção do biofilme foi determinada pela diferença entre o número de células aderidas aos cupons submetidos ao tratamento e os cupons não submetidos. Maior remoção foi observada nos cupons tratados com ácido peracético, glutaraldeído e álcool 70% comparados aqueles tratados com detergente enzimático, lavagem ultra-sônica e solução salina. Os três primeiros tiveram eficiências similares, demonstradas pelos métodos CBV e MEV. O efeito dos tratamentos em *S.aureus* foi semelhante ao observado em *P. aeruginosa*, exceto a lavagem ultra-sônica que em *S.aureus* demonstrou melhor desempenho. Os tratamentos utilizados neste trabalho reduziram o biofilme em cupons de canetas odontológicas, mas não o removeram completamente, comprometendo a biossegurança na reutilização das canetas.

**Palavras-chave:** biofilme; *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., biocida, caneta odontológica.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p.) Março, 2010.

# **IN VITRO PRODUCTION OF BIOFILM IN DENTAL PENS AND EFFICIENCY OF DIFFERENT TREATMENTS IN REMOVAL<sup>2</sup>**

Author: Valdionir da Rosa Freitas  
Advisor: Amauri Braga Simonetti

Rotating pens during its use in dental offices come into contact with the oral microbiota and may bring consequences to the patient or to others who use the same equipment, if there is not a clean suitable for reuse. To evaluate the efficiency of different treatments utilized routinely for cleaning dental equipments, this study describes the *in vitro* biofilm production on surfaces of dental pens and the efficiency of the biocides glutaraldehyde, peracetic acid, alcohol 70%, detergent enzyme and ultrasound rinsing for biofilm removal, using *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. For the standardization of methods, and growth curves of both microorganisms, adhesion tests were performed on coupons obtained by cutting the pens. We tested different incubation times for the production of biofilm, whose maximum value was obtained in 14 days. Evaluation of biofilm formation was performed by the method of counting viable bacteria (CBV) and scanning electron microscopy (SEM) and Crystal Violet method. The efficiency of treatments on biofilm removal was determined by the difference between the number of cells attached to coupons submitted and not submitted to treatment. Higher removal was observed on the coupons treated with peracetic acid, glutaraldehyde and 70% alcohol than in those treated with enzyme detergent, ultrasonic washing and saline. The first three had similar efficiencies, as demonstrated by CBV and SEM. The effect of treatment on *S. aureus* was similar to that observed in *P. aeruginosa*, except for ultrasonic washing in *S. aureus* that showed better performance. Therefore, the treatments used in this work reduced but not completely removed the biofilm in dental coupons pens, which can compromise the biological safety when they are reused.

Keywords: biofilm, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., biocide, dental pen.

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p.)  
Março, 2010.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO .....	VII
LISTA DE TABELAS.....	XIX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivo específico.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Canetas odontológicas.....	4
3.1.1 Composição da caneta odontológica.....	6
3.2 Contaminação nas linhas de água e biofilme em consultório odontológico.....	6
3.3 Biofilme.....	9
3.3.1 Etapas de formação.....	13
3.3.2 Fatores de adesão.....	15
3.3.2.1 Micro-organismo.....	15
3.3.2.2 Superfície.....	17
3.3.2.3 Meio.....	18
3.4 <i>Quorum sensing</i> .....	21
3.5 As bactérias.....	22
3.6 Métodos de detecção.....	24
3.7 Procedimentos usuais no controle de infecção.....	27
3.7.1 Lavagem ultra-sônica.....	30
3.7.2 Detergente enzimático.....	31
3.7.3 Glutaraldeído.....	32
3.7.4 Álcool.....	33
3.7.5 Ácido peracético.....	35
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Obtenção dos micro-organismos para os ensaios.....	37
4.1.1 Meios de cultivo.....	37
4.1.2 Avaliação do crescimento dos micro-organismos.....	37
4.2 Avaliação da formação de biofilme.....	38
4.2.1 Testes de viabilidade.....	38
4.2.1.1 Avaliação da produção de cápsula.....	39
4.2.1.2 Avaliação da produção de biofilme pelo método Cristal Violeta.....	39
4.2.2 Avaliação da produção de biofilme em superfície de alumínio.....	41
4.2.2.1 Condições de cultivo.....	41
4.2.2.2 Preparação dos cupons.....	42
4.2.2.3 Preparação do inóculo.....	42
4.2.2.4 Indução de biofilme <i>in vitro</i> .....	42
4.2.2.5 Quantificação de bactérias aderidas.....	44

4.2.2.6 Avaliação da adesão por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	44
4.3 Análise de canetas odontológicas.....	45
4.3.1 Superfície externa.....	45
4.3.2 Superfície interna.....	45
4.4 Isolamento e identificação dos micro-organismos.....	46
4.5 Tratamentos para a remoção do biofilme.....	46
4.5.1 Preparo das soluções.....	47
4.5.2 Exposição aos tratamentos.....	48
4.5.2.1 Lavagem ultra-sônica.....	50
4.6 Análise estatística.....	51
5.0 RESULTADOS.....	52
5.1 Curvas de crescimento.....	52
5.2 Avaliação da produção de biofilme pelo método Vermelho Congo.....	53
5.3 Avaliação da produção de biofilme pelo método Cristal Violeta.....	54
5.4 Produção de biofilme <i>in vitro</i> em superfície de alumínio.....	56
5.5 Tratamentos dos cupons.....	59
5.6 Análise de canetas odontológicas manipuladas.....	63
5.7 Identificação dos micro-organismos.....	63
6.0 DISCUSSÃO.....	66
6.1 Escolha dos micro-organismos.....	66
6.2 Avaliação da formação de biofilme.....	66
6.2.1 Método agar congo vermelho.....	66
6.2.2 Método cristal violeta.....	67
6.3 Biofilme em cupom de alumínio.....	70
6.4 Eficiência dos tratamentos para remoção do biofilme.....	75
7.0 CONCLUSÕES.....	85
8.0 PERSPECTIVAS.....	87
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
10.0 ANEXOS.....	98

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Concentração e tempo de exposição dos agentes químicos utilizados para remoção de biofilmes das canetas odontológicas.....47
- Tabela 2. Valores médios de absorvância das amostras de *P.aeruginosa* e *S. aureus* obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método de Cristal Violeta.....55
- Tabela 3. Formação de biofilme após a interpretação dos valores de absorvância de acordo com a equação de Stepanovic et al. (2007) (Figura 3).....55
- Tabela 4. Comparação entre o número de bactérias aderidas de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* obtidos por contagem de bactérias viáveis de cupons tratados e cupons não tratados e o nível de significância.....60
- Tabela 5. Testes de identificação para cocos Gram positivos a partir de amostras coletadas por suabe da superfície de canetas odontológicas após a sua utilização.....63
- Tabela 6. Testes de identificação para bacilos Gram positivos a partir de amostras coletadas por suabe da superfície de canetas odontológicas após a sua utilização.....63
- Tabela 7. Testes de identificação para bacilos Gram negativos a partir de amostras coletadas por suabe da superfície de canetas odontológicas após a sua utilização.....64
- Tabela 8. Bactérias isoladas da superfície de 13 canetas odontológicas com sem lavagem prévia à coleta em tempos diferentes de uso. Para cada te foram testados um total de 4 canetas, sendo 2 canetas com lavagem prévia e 2 canetas sem lavagem prévia.....64

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Caneta odontológica, (B) Refrigeração, (C) Compartimento interno da caneta, (C-1) Saída de ar, (C-2) Entrada de ar, (C-3) Entrada de água.....05
- Figura 2. Equipo odontológico composto por reservatório, linhas de água, caneta odontológica e cadeira odontológica.....05
- Figura 3. Equação de Stepanovic et al. (2007) aplicadas para interpretação das absorbâncias obtidas pelo MCV. (A) Absorbância. (A.c) Absorbância de Corte.....41
- Figura 4. Cupons inseridos inicialmente em frasco contendo suspensão de bactérias em BHI foram a cada 48 h retirados e lavados em solução salina e submetidos a medidas de contagens e microscopia eletrônica de varredura. O meio BHI foi trocado a cada 48 h durante 14 dias.....43
- Figura 5. Curvas de crescimento de *P. aeruginosa* e *S. aureus* expressas em UFC.mL.<sup>-1</sup>, crescida em caldo BHI, a 37°C sob agitação constante.....52
- Figura 6. Método Agar Vermelho Congo para verificar a produção de cápsula. (A) *S. aureus* produtor de cápsula. (B) *P. aeruginosa* produtor de cápsula (C) Klebsiella (controle positivo): colônias negras e rugosas (D) *Citrobacter* (controle negativo): colônias vermelhas e lisas.....54
- Figura 7. Avaliação da adesão *in vitro* de *P.aeruginosa* e *S. aureus* a cupons de alumínio, expressa em unidades formadoras de colônias durante 14 dias de incubação.....56
- Figura 8. Fotomicrografias mostrando a adesão bacteriana a cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em diferentes tempos de incubação. A coluna **A** indica as fotomicrografias referentes a *P. aeruginosa*. A coluna **B** representa fotomicrografias referentes a *S. aureus*. As setas mostram estruturas sugestivas de matriz polimérica \* não foi possível obter fotomicrografias do cupom referente a *S. aureus* no quarto dia de incubação.....57
- Figura 9. Número de células aderidas ao cupom após a aplicação dos tratamentos em *P. aeruginosa* e *S. aureus* expressos em unidades formadoras de colônia.....60

Figura 10. Fotomicrografias (MEV) mostrando a adesão bacteriana a cupons de alumínio provenientes de caneta odontológica obtidas após os tratamentos para remoção de biofilme formado em 14 dias de incubação. A coluna **A** representa os tratamentos aplicados. A coluna **B** é referente a *P. aeruginosa*. A coluna **C** é referente a *S. aureus*.....61

Figura 11. Fotomicrografias de superfície interna de caneta odontológica de tempo de uso indeterminado por microscopia eletrônica de varredura.....65

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABAL: Associação brasileira do alumínio  
ACPO: Associação de consciência à prevenção ocupacional  
ADA: American dental association  
Al: Alumínio  
AVC: Agar vermelho congo  
BHI: Infusão de cérebro e coração  
CBV: Contagem de bactérias viáveis  
CDC: Centro de prevenção e controle de doenças  
EPI: equipamento de proteção individual  
MCV: Método cristal violeta  
MEV: Microscopia eletrônica de varredura  
MS: Ministério de saúde  
RPM: Rotação por minuto  
TSA: Agar triptona de soja  
TSB: Caldo triptona de soja  
UFC: Unidades formadoras de colônias  
TSI: Tríplice sugar iron  
SIM: Sulfeto indol motilidade  
CIM: Corrosão influenciada microbiologicamente

## 1. INTRODUÇÃO

Em consultórios odontológicos são utilizados instrumentos rotatórios para realizar procedimentos em tecidos dentários. Um desses instrumentos é a caneta odontológica que, durante seu uso, entra em contato com a microbiota oral e gera a formação de aerossóis dispersados no ambiente do consultório. Esses instrumentos, quando conectados a brocas, tornam-se ferramentas de corte, podendo ser utilizados em procedimentos cirúrgicos, penetrando na mucosa bucal, em tecidos subepiteliais e vasos. Em razão disso, as canetas devem ser submetidas a processos de desinfecção e esterilização para que sejam reutilizadas.

No entanto, em muitos consultórios odontológicos, falhas na aplicação de medidas de controle de infecção podem comprometer os compartimentos do circuito de abastecimento de água e equipamentos odontológicos. A presença de bactérias nesses circuitos e equipamentos poderá favorecer o desenvolvimento de biofilme que são capazes de se aderir em superfícies bióticas e abióticas. Essa adesão pode acarretar uma série de problemas aos equipamentos como, por exemplo, a biocorrosão. Além disso, biofilmes aderidos à superfície de equipamentos médico-odontológicos, podem causar uma contaminação, pois os mesmos permanecem viáveis mesmo após a limpeza e desinfecção dessas superfícies, afetando, neste sentido, a qualidade e segurança de procedimentos. Inúmeras substâncias tais como ácido peracético, glutaraldeído, álcool e detergente enzimático, entre outras têm sido utilizadas na rotina de consultórios

odontológicos para promover a desinfecção na superfície de instrumentos de rotação e favorecer a remoção de biofilme produzido na caneta odontológica. Os protocolos para o uso de biocidas industriais são padronizados por testes laboratoriais e realizados dentro das condições indicadas pelo fabricante. Esses compostos geralmente são aprovados em testes de suspensão e de diluição de uso, utilizando-se bactérias na forma planctônica e não bactérias em estrutura de biofilme.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a formação de biofilme formado em canetas odontológicas e testar diferentes tratamentos para sua remoção.

### 2.2 objetivo específico

Induzir biofilme *in vitro* utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em corpos de prova de canetas odontológicas.

Avaliar produção de biofilme por contagem de bactérias viáveis e microscopia eletrônica de varredura

Avaliar a produção de cápsula por método Vermelho Congo.

Testar a formação de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno por método Cristal Violeta.

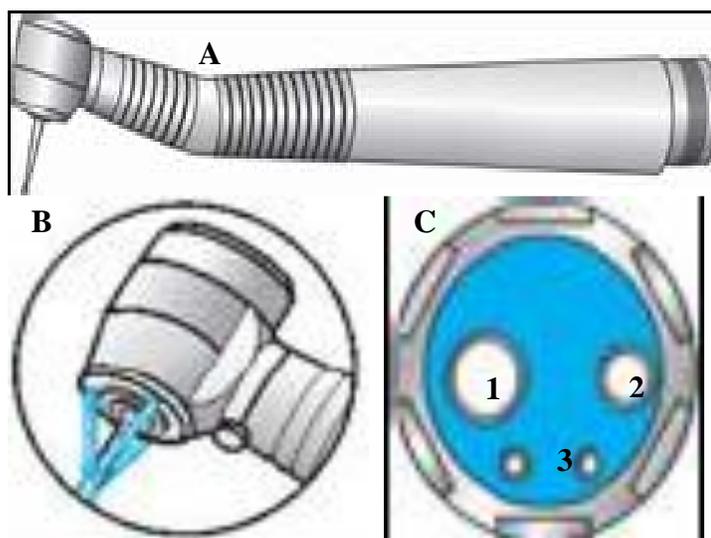
Verificar o efeito de tratamentos utilizando ácido peracético, glutaraldeído, álcool, detergente enzimático e lavagem ultra-sônica em biofilme induzido em cupons odontológicos.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

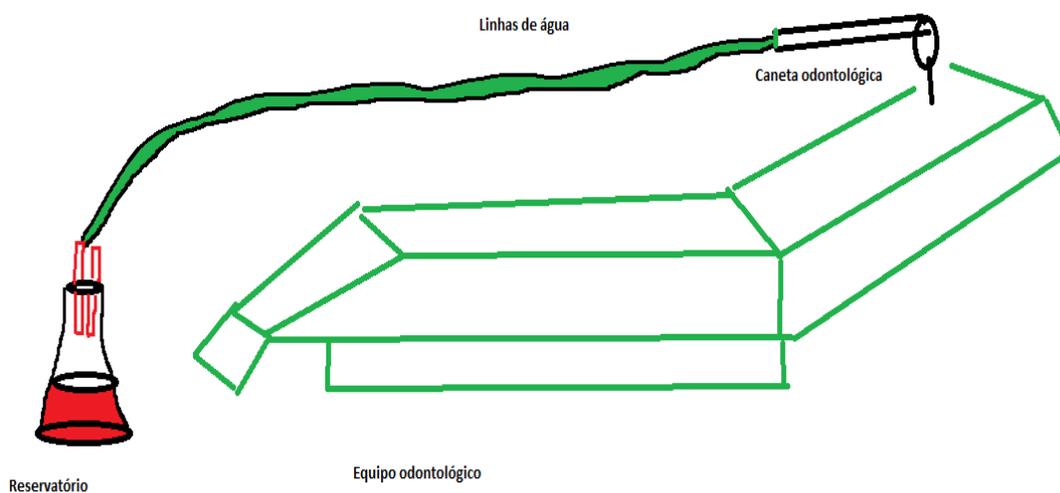
#### **3.1 Canetas odontológicas**

As canetas odontológicas são instrumentos rotatórios que conectadas a brocas são utilizadas para realizar procedimentos em tecidos dentários. Alguns desses procedimentos abrangem polimento, preparo cavitário e até cirurgia. Seu funcionamento é a base de propulsão de ar e água através de um sistema de abastecimento de água (Figura 1). A propulsão de água promove a refrigeração de brocas, pois essas aumentam a temperatura em razão do atrito (Araújo & Lopes-Silva, 2002). A ejeção de ar promove o turbilhamento das canetas, atingindo rotações de até 450.000 rotações por minuto (Dabionline, 2003; Franco et al., 2005).

O sistema de linhas de abastecimento de água é vinculado ao equipamento odontológico. Esse sistema é composto pelo reservatório de água, pelas linhas de água, pelas canetas de baixa e alta rotação e pela seringa tríplice. A seringa tríplice é um instrumento auxiliar e tem a propriedade de ejetar ar e água, por isso é também designada como seringa ar-água. Os circuitos de água conectam o reservatório às canetas e à seringa tríplice, dispostas na porção distal do sistema conforme mostra a Figura 2 abaixo.



**FIGURA 1.** (A) Caneta odontológica, (B) Refrigeração, (C) Compartimento interno da caneta, (C-1) Saída de ar, (C-2) Entrada de ar, (C-3) Entrada de água. (Fonte: Dabi atlante, 2007).



**FIGURA 2.** Equipo odontológico composto por reservatório, linhas de água, caneta odontológica e cadeira odontológica.

### **3.1.1 Composição da caneta odontológica**

As canetas odontológicas são compostas basicamente por alumínio (Moraes, 2008). Porém, os primeiros modelos foram fabricados com latão e também aço inox. A caneta de alumínio possui a vantagem de ser mais leve, podendo ser esterilizável até 135°C em autoclave. O alumínio possui propriedades que representam grandes vantagens na sua utilização: maleável e de baixa densidade; resistente à corrosão; bom condutor de calor, de eletricidade e pode ser polido.

As propriedades mecânicas do Al incluem limite de resistência de tração, alongamento, dureza e limite de resistência de cinzelamento.

### **3.2 Contaminação nas linhas de água e biofilme em consultórios odontológicos**

Em consultórios odontológicos, falhas na aplicação de medidas de controle de infecção podem comprometer todos os compartimentos do circuito de abastecimento de água no equipamento odontológico e favorecer a disseminação de micro-organismos (Medeiros et al., 1998; Silva et al., 2002). Alguns estudos mostram, a partir da avaliação da qualidade da água, o grau de contaminação em reservatórios odontológicos. A análise microbiológica das amostras de água tem demonstrado em seus resultados uma quantidade acima de 5700 ufc/mL que excederam aos padrões de potabilidade estabelecidos pelo Ministério da Saúde

(MS) e pela American Dental Association (ADA) que são de 500 e 200 UFC por mililitro, respectivamente (Araújo & Lopez-Silva, 2002; Galvão et al., 2006).

As tubulações e linhas de água do equipamento odontológico também podem apresentar contaminação, sendo muitas vezes mais intensa que em reservatórios de água, caso não haja tratamento adequado após o seu uso (Galvão et al., 2006). Um estudo de Chibebe et al. (2002) avaliou o nível de contaminação da seringa tríplice em amostras de água coletadas desses equipamentos, após seu uso. A análise apresentou níveis de contaminação que excederam padrões preconizados pela ADA. Alguns pesquisadores relatam que a presença de micro-organismos patogênicos como *Pseudomonas sp.*, *Legionella sp.*, *Mycobacterium*, *Candida*, etc. em amostras de água de reservatórios pode não estar relacionada aos tipos de água utilizados para o abastecimento nem tão pouco ao tipo de limpeza realizada nesses reservatórios (Walker et al., 2000; Moreira et al., 2006).

O uso de seringa tríplice e canetas odontológicas de alta rotação, durante procedimentos clínico-cirúrgicos, geram a formação de aerossóis que atingem o ambiente físico do consultório contaminando-o. Aerossol é a suspensão de qualquer volume de ar contendo partículas sólidas ou líquidas em suspensão. Partículas de aerossol chegam a atingir uma distância de até 1,82 m a partir da boca do paciente. Barreiras físicas que reduzam a dispersão do aerossol e a prática do bochecho com anti-séptico previamente à consulta, podem ser usadas como medidas preventivas de contaminação (Discacciati et al., 1998; Gonçalves et al., 2006).

O contato da ponta de seringa tríplice com a mucosa bucal do paciente favorece a contaminação imediata desse instrumental. A desinfecção de pontas de seringa tríplice recém usadas e contaminadas com microbiota bucal, utilizando-se álcool 70%, é insuficiente para níveis de segurança biológica, embora reduza o número de micro-organismos (Russo et al., 2000).

A contaminação das canetas pode ocorrer tanto na superfície externa como também em seu interior, em razão do refluxo de água e da sua qualidade microbiológica (Araújo & Lopez-Silva, 2002).

Walker et al. (2000) demonstraram a presença de biofilme em circuitos de água dos equipamentos odontológicos na Inglaterra a partir da avaliação da água coletada nesses circuitos. A análise foi realizada por contagem de células viáveis e por microscopia e os resultados indicaram contaminação microbiana acima dos níveis considerados seguros.

Souza-Gugelmin et al. (2003) demonstraram a contaminação decorrente da formação de biofilme microbiano nas tubulações das linhas de água de equipamentos odontológicos, todos instalados em clínicas particulares. As amostras colhidas do reservatório, da seringa tríplice e da caneta de alta rotação mostraram em seus resultados, que o nível final de contaminação da água recuperada a partir da caneta de alta rotação e da seringa tríplice superou significativamente o nível inicial, verificado no reservatório. A conclusão foi de que a água do equipamento odontológico possivelmente tenha sido contaminada pelo

biofilme microbiano, formado nas tubulações ao longo do tempo. A formação do biofilme ocorre onde há micro-organismos e superfície de suporte em meio aquoso (Chibebe et al., 2002).

Szymanska (2005) avaliou a presença de biofilme em amostras de água proveniente da superfície dos túbulos envolvendo linhas de água de canetas de alta e baixa rotação e seringa tríplice antes de procedimentos de desinfecção. Foi observado biofilme em todas as amostras não pré-desinfetadas. Os tubos que foram desinfetados não apresentaram biofilme.

Franco et al. (2005), a partir de uma revisão detalhada, apontam aspectos relevantes da formação de biofilme e do controle microbiano na prática odontológica, evidenciando uma série de riscos de infecção cruzada provocada por biofilme nos consultórios odontológicos. Para reduzir esse problema, os autores sugerem a realização de procedimentos de desinfecção adequados às recomendações oficiais, aliados a aquisição de equipamentos que contenham um sistema anti-retração de água e um sistema de injeção interna de soluções biocidas para a desinfecção de circuitos de linhas autoclaváveis. O tratamento da água utilizada nesses equipamentos também é sugerido por esses pesquisadores. Tais resultados devem ser alcançados com a adesão dos profissionais ao cumprimento e manutenção das normas preconizadas pelos órgãos competentes.

### **3.3 Biofilme**

Biofilme é definido como um conjunto de micro-organismos formado por uma ou mais espécies envolvidos numa matriz polimérica extracelular, aderido a

uma superfície (Costerton et al., 1999; Davey & O'Toole, 2000). Em estudos *in vitro*, alguns autores estendem a definição de biofilme ao número de células aderidas à superfície. Ronner & Wong (1993), por exemplo, estimam que o número de células aderidas deva ser  $10^5$ , enquanto que Andrade et al. (1998) postulam  $10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC) aderidas. Já, Wirtanen et al. (1996) consideram que o biofilme deve constituir  $10^3$  células aderidas.

Alguns autores chegam a estimar que a estrutura do biofilme tenha uma composição de mais de 90 % de matriz polimérica hidratada e aproximadamente 10% de micro-organismos como parte da sua biomassa, por isso sendo considerado um complexo adsorvente poroso e de aspecto gelatinoso. Essa consistência tem ainda a vantagem de retardar uma possível desidratação, já que a capacidade de reter líquido é superior à quantidade de massa (Melo, 2008).

A matriz polimérica é uma estrutura complexa, podendo ser composta por proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e heteropolímeros, tais como glicoproteínas, fosfolipídios, alginatos etc. Ela é responsável pela estrutura do biofilme e a sua composição determina algumas propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes. Uma de suas propriedades é de tornar-se impermeável a certos agentes antimicrobianos, impedindo a sua difusão (Hentzer et al., 2001; Branda et al., 2005; Monds & O'Toole, 2009; Rohde et al., 2009).

O advento da microscopia confocal, que reúne tecnologia computacional barata, software sofisticado, microscópica óptica tradicional e dispositivos digitais, demonstrou ser um método adequado para o estudo de biofilme microbiano trazendo imagens atuais do mesmo e conseqüentemente uma nova perspectiva

em seu conceito. Essa ferramenta levou à revisão da concepção inicial do biofilme que anteriormente era estudado utilizando-se microscopia óptica e eletrônica. O conceito de biofilme variou de uma distribuição homogênea de células numa matriz polimérica extracelular uniforme para um modelo baseado em uma significativa variabilidade e heterogeneidade (Costerton & Lewandoski, 1995).

Dentro da atual concepção de biofilme, estudos recentes mostram, a partir de imagens de microscopia confocal, modelos de biofilme que apresentam uma estrutura com distribuição variável de células, agregados celulares na matriz polimérica extracelular além de espaços vazios ou canais de água, que podem ou não ser contínua com a fase líquida (Costerton & Lewandoski, 1995).

A descoberta do fluxo de convecção dentro dos canais de água tem revolucionado o conceito de crescimento bacteriano no biofilme. Os canais de água compreendem uma rede “em anastomose” que transporta o fluido do biofilme.

A composição do biofilme é heterogênea, configurando uma estrutura complexa de micro-colônias e canais que permitem fluxo de fluidos e nutrientes (Surman et al., 1995). Células dentro de uma microcolônia apresentam um grau de homeostase importante nas relações de cooperação entre os micro-organismos, e no intercâmbio de nutrientes e metabólicos com a fase líquida (Costerton & Lewandoski, 1995).

O biofilme funciona como um consórcio de células em cooperação biológica e eficiência metabólica especialmente quando atinge a maturidade. Nessa fase as células situadas em regiões diferentes exibem distintos padrões de expressão gênica (Kirisits & Parsek, 2006).

A adesão dos micro-organismos às superfícies apresenta aspectos considerados “vantajosos” para o homem. Um desses aspectos é o fato do biofilme poder ser utilizado em estações de tratamento de águas, removendo micro-organismos patogênicos (Arcuri, 2000). Além disso, na indústria de alimentos, eles podem ser aproveitados para produção de ácido acético e ácido cítrico. Sua aplicação atinge também a indústria farmacêutica e a indústria metalúrgica, produzindo metabólitos importantes e extraindo metais a partir de minérios, respectivamente. A utilização de biofilme ocorre também na área da biorremediação, onde ocupa um papel importante na redução de poluentes do solo, substâncias consideradas recalcitrantes (Seo et al., 2009).

Os aspectos tidos como não vantajosos ao homem, no entanto, envolvem a biocorrosão de metais, hoje conhecida como corrosão influenciada microbiologicamente (CIM), em que pode ocorrer dano a superfícies metálicas, equipamentos, tubulações, etc, comprometendo o funcionamento adequado desses materiais (Gaylarde, 1995; Bento & Gaylarde, 2001; Gonçalves et al., 2002; Junior et al., 2002; Lee & Newman, 2003).

A biodeterioração de alimentos e produtos derivados do petróleo, provocados pelo biofilme também pode ser considerada desvantagem nesses setores de produção por causar um impacto econômico devido à perda da qualidade desses produtos. A presença de biofilme em tanques de estocagens de combustíveis pode causar obstrução de filtros (Bento & Gaylarde, 2001; Wilks et al., 2006). No campo da saúde, a grande desvantagem configura a infecção hospitalar, pois a formação de biofilme quando ocorre em estabelecimentos de

saúde, exibe o agravante que é o aumento da população de micro-organismos resistentes á ação de antibióticos, além da possível contaminação de instrumentos, próteses e cateteres, entre outros (Locatelli et al., 2003; Storti et al., 2007; Rohde et al., 2009).

Segundo Martins et al., (2006) a presença de biofilme em tubulações dos equipamentos odontológicas pode estimar o grau de contaminação desses equipamentos. Os biofilmes colonizam e se replicam sobre a superfície interna das tubulações de água, formando glicocálice. Uma vez estruturado, este biofilme funciona como reservatório, ampliando o número de micro-organismos existentes nas linhas de água. A qualidade da água utilizada no tratamento odontológico devem ser assegurada tendo padrões determinados pelos órgãos de controle. Múltiplos tratamentos reduzem o número de bactérias viáveis, porém não destroem o biofilme. Alguns pesquisadores relatam que as estratégias de acionamento e liberação de água nos intervalos entre pacientes não controlam a formação do biofilme ou reduzem sua aderência na tubulação.

### **3.3.1 Etapas de formação**

Em relação ao número de fases necessárias para a formação de biofilme, há diferentes estudos descritos na literatura. Marshall et al. (1971) relatam que a formação do biofilme envolve apenas duas fases. Um processo reversível na primeira etapa e um processo irreversível na segunda fase. A adesão reversível está relacionada às forças Van der Waals geradas por interações moleculares, enquanto que a adesão classificada como irreversível está associada à presença de interações geradas por glicocálice. Notermans et al. (1991) entretanto,

descrevem a formação do biofilme em três fases enquanto Van Houdt & Michiels (2005) afirmam que são necessárias cinco fases.

De maneira geral, a formação do biofilme é iniciada basicamente pela adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas no meio aquoso sobre uma superfície sólida, seguida da formação de uma película ou filme condicionante. Na seqüência, ocorre o deslocamento de micro-organismos e partículas para a superfície sólida. Ao chegar à superfície, os micro-organismos se aderem à mesma, ocorrendo ao mesmo tempo, transferência e consumo de nutrientes na região de interface líquido-biofilme e no interior do filme microbiano. O consumo desses nutrientes favorece o crescimento dos micro-organismos, a célula bacteriana sofre uma mudanças fenotípicas que alteram moléculas estruturais e desencadeiam a síntese de polímeros extracelulares assim como o desenvolvimento gradual de microcolônias definidas como unidades básicas do biofilme. As microcolônias se apresentam em homeostase com o seu ambiente interno condicionado por sua matriz e pela atividade metabólica das células que a compõem. Finalmente, o biofilme maduro pode ainda transportar seus produtos metabolizados para o exterior e se propagar por desprendimento de suas porções devido a processos de erosão superficial (Costerton & Lewandoski, 1995; Chaves, 2004).

A formação do filme, condicionante etapa precursora de todo o processo de desenvolvimento de biofilme, é influenciada pela concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso, pelas condições hidrodinâmicas do meio líquido e

pelas características superficiais do suporte como carga superficial, hidrofobicidade, rugosidade. Além disso, pode alterar consideravelmente as características físico-químicas superficiais do suporte sólido, favorecendo ou reduzindo a adesão bacteriana aos suportes (Marshall & Blainey, 1990; Chamberlain, 1992; Fletcher, 1992) apud (Chaves 2004).

### **3.3.2 Fatores de adesão**

A formação do biofilme depende do tipo de micro-organismo envolvido, da superfície de adesão e das condições que o meio dispõe para o desenvolvimento de biofilme, tais como o pH do meio, a temperatura, a presença de íons, o oxigênio dissolvido e matéria orgânica, entre outros (Pompermayer & Gaylarde, 2000; Davey & O'Toole, 2000; Reisner et al., 2006).

#### **3.3.2.1 Micro-organismo**

As características dos micro-organismos estão relacionadas à carga da superfície celular e ao desenvolvimento de estruturas de membrana importantes no processo de adesão, tais como a formação de flagelos, pili, fimbrias, cápsula e proteínas de superfície, que resultam da expressão genética desencadeada na célula.

Segundo Melo (2008), a carga de superfície das bactérias, sejam elas Gram-positivas ou Gram-negativas, é geralmente negativa, pois as primeiras são constituídas de ácidos teicóicos, teiurônicos e polipeptídeos em sua parede celular e as últimas apresentam carga negativa originária dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa, em conjunto com os polímeros de polipeptídeos. Os ácidos teicóicos se ligam a prótons reduzindo o pH da parede celular.

Em relação ao flagelo, constituído principalmente pela flagelina, este confere motilidade à célula na sua adesão inicial. Após essa etapa, o flagelo sofre diferenciação e adquire propriedades que permitem realizar o deslocamento celular na superfície sólida (O'Toole & Kolter, 1998).

O pili tipo IV pode se aderir a superfícies abióticas ou bióticas, favorecendo a colonização em superfícies e o deslocamento de micro-colônias nas superfícies sólidas (Branda et al., 2005; Risse-Buhl & Küsel, 2008).

Muitos procariontes sintetizam substância polimérica externamente à parede celular, como uma camada viscosa denominada de cápsula. A cápsula é densa, organizada de forma definida e é acoplada firmemente a parede celular. Ela é geralmente constituída de polissacarídeos, embora exista cápsula de natureza proteica. A cápsula atua como reservatório de nutrientes, e além de se constituir um antígeno de superfície bacteriana, está relacionada à sua virulência e a resistência à fagocitose. Quando a camada viscosa é mais fina e não é tão fortemente ligada a parede celular, recebe a denominação de camada limosa sendo classificada como polímero desorganizado e frouxo. A camada limosa também é constituída de polissacarídeos. Devido ao fato da composição química da cápsula e da camada limosa serem similares entre si, alguns autores não fazem distinção entre elas e utilizam o termo cápsula para definir ambas estruturas (Vermelho, 2007).

Embora muitas vezes o termo glicocálice em bactérias seja utilizado para descrever tanto a cápsula como a camada limosa, ele é composto por polissacarídeos ou glicoconjugados extracelulares (Vermelho, 2007). Os

carboidratos presentes na monocamada externa de membranas plasmáticas interagem com proteínas ou lipídios, formando glicoproteínas ou glicolipídios, respectivamente. O glicocálice apresenta diversas funções decorrentes da natureza de sua composição. Ele é importante na adesão e no reconhecimento celular, na determinação de grupos sanguíneos em células animais, entre outras funções (Costerton & Lewandoski, 1995).

### **3.3.2.2 Superfície**

As características da superfície do suporte têm papel importante na adesão e estão relacionadas à hidrofobicidade, à carga de superfície, à composição do material bem como à topografia do material, como a rugosidade.

A hidrofobicidade é definida como energia hidrofóbica de atração e, em termos de energia livre, estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. Quando a energia livre de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é positiva, a superfície é considerada hidrofílica, ou seja, as moléculas do sólido são repulsivas entre si, tendo maior afinidade com a água. No entanto, quando a energia livre global de interação entre as moléculas das superfícies imersas em água é negativa, a superfície é considerada hidrofóbica, ou seja, as moléculas do sólido são atrativas entre si, tendo maior afinidade entre si do que pela água (Van Oss & Giese, 1995). Entre os vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade de superfícies celulares destacam-se adesão a hidrocarbonetos, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico, cromatografia de interação hidrofóbica, agregação por adição de sais,

adesão a superfícies hidrofóbicas e medição de ângulos de contacto (Chaves, 2004).

O tipo de composição da superfície do material poderá interferir na hidrofobicidade uma vez que a presença de determinados grupos iônicos poderão reagir na superfície, reduzindo a sua hidrofobicidade. Em um ensaio para avaliar formação de biofilme Marques et al. (2007) demonstraram que *S. aureus* é capaz de aderir em superfícies consideradas hidrofílicas tais como vidro e aço inoxidável, formando biofilme.

A condição topográfica da superfície também é um fator importante na formação de biofilmes, pois a deposição de micro-organismos ocorre geralmente em áreas de maior irregularidades (Hilbert et al., 2003). A rugosidade de uma superfície pode aumentar a retenção de micro-organismos, pois representam locais de abrigo menos influenciados pelas forças do fluido (Bott, 1993; Flint et al., 1997).

### **3.3.2.3 Meio**

A adesão celular também é influenciada pelas características do meio. Essas condições envolvem o pH, a pressão osmótica, a temperatura, a velocidade do fluxo do meio aquoso, a presença de matéria orgânica e as fontes nutricionais do micro-organismos (Bott, 1993; Jefferson, 2004; Rode et al., 2007).

O pH pode influenciar a formação de biofilme basicamente de duas maneiras: a primeira é em relação ao crescimento dos micro-organismos, pois grande parte desses possui atividade metabólica em pH próximo à neutralidade e sua variação pode afetar a formação do biofilme. A segunda é em relação às

propriedades superficiais dos micro-organismos que, dependendo do pH, podem aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática e interferir no processo de adesão dos micro-organismos às superfícies (Bott, 1993).

Outro aspecto importante é a redução do pH provocada pela turbulência de fluidos. A agitação do líquido pode gerar gás carbônico que reage com a água e forma compostos ácidos, como o ácido carbônico, em razão da combinação entre gás carbônico e água (Caldwell et al., 1992). Além disso, valores reduzidos de pH também podem ser decorrentes da presença de produtos metabólicos ácidos dos micro-organismos naquele meio.

A temperatura é um fator físico importante para o crescimento microbiano e conseqüentemente para a formação de biofilmes (Rode et al., 2007). Nesse sentido, o crescimento microbiano pode ser afetado por temperaturas que excedam demasiadamente a temperatura ótima, uma vez que ocorre a desnaturação das proteínas que compõe os micro-organismos, indicada pela rápida redução da taxa de crescimento, embora existam micro-organismos que exibem como forma de resistência a elevações de temperatura o endosporo. Em contrapartida, quando a temperatura é reduzida a valores muito abaixo de seu ponto ótimo, a redução da taxa de crescimento ocorre gradualmente até cessar (Vermelho, 2007).

A velocidade de escoamento da água influencia no desenvolvimento do biofilme do seu desprendimento. Em um estudo Bott (1993) sugere que a redução do biofilme em tubos de troca de calor ocorre quando a velocidade de escoamento atinge níveis superiores à 1m/s.

Em ensaio experimental Rode et al. (2007) concluíram que *S. aureus* incubado em condições estáticas formam mais biofilme do que em condições dinâmicas.

Quando a velocidade do fluido é baixa os micro-organismos tendem aderir à superfície individualmente originando, a partir disso, colônias. Em contrapartida, em velocidades altas, a adesão celular ocorre em aglomerados (Chaves, 2004).

Os mecanismos de transferência de massa podem interferir no crescimento do biofilme. Nesse processo, a massa tem fluxo do seio do líquido para a superfície do biofilme. Essa transferência pode ocorrer por difusão molecular, quando o líquido está parado, e por convecção forçada ou difusão turbulenta, quando o líquido está em regime de fluxo turbulento (Melo, 1994). Conseqüentemente, em fluxo baixo pode ocorrer menor transferência de nutrientes e oxigênio às células, implicando prejuízo à formação de biofilme. Fluxos elevados, no entanto, aumentam essas trocas de massa no seio do líquido, provendo o biofilme de nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. O aumento do fluxo, no entanto, pode também reduzir a biomassa fixada na superfície, uma vez que as forças de tensão elevada produzida no fluido podem causar erosão e desprendimento de biofilme (Chaves, 2004).

A privação de nutriente em um biofilme pode desencadear o desprendimento de bactérias, que ao se tornarem planctônicas, podem se deslocar para um habitat melhor (Jefferson, 2004).

Em estudo sobre nutrição microbiana, alguns autores relatam que a formação protoplasmática dos micro-organismos depende de uma fonte de

energia que promove o crescimento celular, de aceptores de elétrons para a redução de compostos durante a produção de energia nas reações de biossíntese, além de nutrientes essenciais e alguns fatores de crescimento.

O desenvolvimento do biofilme depende da característica do micro-organismo de assimilar quantidades mínimas de nutrientes no meio bem como da disponibilidade desses nutrientes sob a forma de carbono orgânico (Davey & O'Toole, 2000).

### **3.4 Quorum-sensing**

As etapas do ciclo do biofilme envolvem o sistema de comunicação célula-célula, chamado de *quorum-sensing* (Costerton et al 1987). Os micro-organismos regulam a sua expressão gênica de acordo com a sua densidade populacional. Para isso, são secretados auto-indutores, compostos sinalizadores que se ligam a receptores e acionam a transcrição de determinados genes. Essa ligação pode produzir inúmeros efeitos tais como a formação de biofilme, produção de fatores de virulência, transferência horizontal de genes, produção de antibióticos e outros metabólitos secundários e bioluminescência (Vermelho, 2007).

A manutenção do biofilme em todo seu ciclo requer um adequado sistema de comunicação célula-célula, denominado QS. As bactérias Gram-positivas ativam QS usando oligopeptídeos detectados por proteínas. As bactérias gram-negativas geralmente usam lactonas homoserina-aciladas (LHA) como moléculas-sinal difusíveis dos sistemas QS (*las* e *rhl*), que regulam a expressão de genes de virulência em *P. aeruginosa*. O sistema *las* consiste nos ativadores LasR e LasI, os quais dirigem a síntese do auto-indutor, que é uma LHA (lactona

homosserina N-(3-oxododecanoil)). A indução de LasB, que codifica a elastase e outros fatores de virulência requerem LasR e LHA. O sistema rhl consiste nos ativadores RhIR e RhII, que dirigem a síntese de lactona homosserina N-butiril. Para produzir ramnolipídeo, *P. aeruginosa* precisa do sistema *rhl* (Vermelho, 2007).

No caso de QS dos *S. aureus* o sistema de comunicação bacteriana é ativado a partir da densidade de células presentes nos biofilmes. Esse volume de células é atingido ao final da fase exponencial de crescimento quando é acionado o locus *agr* por um mecanismo auto-regulatório que envolve um peptídeo modificado que sinaliza a densidade celular (Vuong et al., 2000).

### **3.5 As bactérias**

As bactérias são os micro-organismos mais encontrados em um biofilme, pois elas geralmente apresentam altas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e capacidade de produção de substâncias extracelulares (Chaves, 2004).

Entre as bactérias mais freqüentes em estudos de biofilme Mattila-Sandholm & Wirtanen (1992) citam, em sua revisão, as do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Staphylococcus*.

*Pseudomonas* é um bacilo Gram-negativo aeróbio, não formador de endosporos, com flagelo polar. *P. aeruginosa* é a espécie mais comum deste gênero. *Pseudomonas* são pouco exigentes em termos nutricionais, por isso, são capazes de se desenvolver em ambientes contendo apenas traços de nutrientes. A facilidade de se desenvolver em soluções aquosas, quando presentes em ambiente hospitalar, podem gerar contaminação de uma série de equipamentos e

soluções terapêuticas. São considerados organismos não fermentadores de glicose (Levinson & Jawetz, 2005).

Estafilococos são cocos esféricos, Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formam esporos, exibem metabolismo fermentativo com produção de ácido, são mesófilos, produtores de catalase e não apresentam motilidade (Kloos & Bannerman, 1999). *S. aureus* é uma espécie que causa vários tipos de infecção como abscessos, intoxicação alimentar, endocardites, osteomielites, entre outras. Sua virulência está relacionada à produção de uma grande variedade de exoproteínas que contribuem para a colonização e infecção. Além disso, secretam enzimas e citotoxinas cuja principal função é disponibilizar nutrientes necessários para sua multiplicação (Dinges et al., 2000; Levinson & Jawetz, 2005).

A formação do biofilme por *Staphylococcus* está relacionada à síntese do polissacarídeo intercelular adesina (PIA), também chamado de poly-N-succinil- $\beta$ -1,6-glucosamina. O polissacarídeo é sintetizado por enzimas que são codificadas pelo gene do locus *ica* do operon *ica*ABCD. A regulação desses genes depende de estímulos ambientais como temperatura, pH, glicose, pressão osmótica entre outros. (Stanley & Lazazzera, 2004; Rohde et al., 2009). No processo de formação do biofilme a adesão primária é promovida especialmente pelo polissacarídeo capsular adesina PS/A cuja síntese é regulada pelo locus *ica*; em seguida, camadas estratificadas de células são formadas devido à produção do PIA, também controlado pelo locus *ica*ADBC. Segundo Rohde et al. (2009) já foram identificados genes *ica*ADBC em bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Bordetella* o que sugere que a síntese de PIA está envolvida na

formação de biofilme em grupos diversificados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

### **3.6 Métodos de detecção**

Atualmente a diversidade de técnicas permite avaliar inúmeros aspectos importantes no biofilme desde o início da adesão até seu estabelecimento. Além disso, é possível avaliar também a topografia da superfície bem como a formação de camadas bacterianas formando agregados de biofilme e seu desprendimento deste. A escolha de uma técnica de observação adequada permite até mesmo o estudo da influência da presença de fimbrias e produção de exopolissacarídeos na formação do biofilme, além da ação de agentes sanitizantes (Rosado, 2008).

De uma maneira geral, os métodos de detecção são divididos em dois grupos: os métodos visuais e os métodos não visuais (Macedo, 2000).

Os métodos visuais compreendem basicamente a microscopia de contraste, a de epifluorescência, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (Macedo, 2000). Além disso, também podem ser utilizados microscopia ótica, de força atômica e confocal (Parizzi, 2004).

A MEV possibilita a avaliação de estruturas complexas com grande magnitude. O preparo da amostra envolve a sua fixação em glutaraldeído, seguida de sua desidratação gradual em concentrações crescentes de álcool (Surman et al., 1995). O MEV usa elétrons que se dispersam ou são emitidos a partir da superfície da amostra, sendo a camada condutora geralmente ouro ou carbono. (Castro, 2002). Em estudo realizado por Locatelli et al. (2004) foi demonstrada a

adesão de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone, utilizando MEV.

A microscopia de contraste é recomendada para acompanhar o desenvolvimento do biofilme em tempo real, numa superfície transparente (Macedo, 2000).

A microscopia de epifluorescência (EPF) é uma alternativa viável para quantificação de células aderidas às superfícies. A técnica permite contar células em números entre 10 e 100, mostrando uma sensibilidade alta. Além disso, é possível detectar micro-organismos que ficam protegidos em rachadura e fendas na superfície de adesão. O método tem como princípio a utilização de anticorpos fluorescentes que se ligam às células, permitindo sua observação ou substâncias fluorescentes como o alaranjado de acridina para coloração direta das células (Parizzi et al., 2004).

**Na microscopia confocal** a análise direta como a avaliação digital apoiados a recursos indiretos induzidos por agentes químicos ou gerados por meios físicos, tais como sondas, permite a avaliação *in situ* de biofilme mantendo sua integridade ao dispensar a fixação da amostra tratadas com agentes químicos que, quando aplicados no preparo de técnicas microscópicas convencionais, danificam a estrutura do biofilme. a microscopia confocal também permite o exame dos biofilmes desenvolvidos em superfícies não-transparentes como, por exemplo, minerais, metais, géis, óleos sintéticos. A técnica pode ser usada para fornecer informações detalhadas sobre a morfologia das células, o metabolismo celular,

filogenia celular, bem como o desenvolvimento da arquitetura física e química de polímeros (Costerton & Lewandoski, 1995).

Existem vários métodos não visuais utilizados na avaliação de aderência bacteriana e formação de biofilmes. Em um modelo experimental, Romanova et al. (2007) utilizaram três diferentes métodos não visuais para testar método novo de detecção de biofilme. As técnicas incluíram tratamento com cristal violeta, bioluminescência de ATP total e contagem em placa. Nesse estudo a utilização do método cristal violeta contribuiu para avaliar a biomassa total formada. Este método tem sido utilizado para demonstrar biomassa e destacar fatores de virulência produzidos por *Staphylococcus* sp (Stepanovic et al., 2000).

Medidas de bioluminescência são importantes como indicadores de biomassa viva. O método permite detectar rapidamente atividade metabólica de células em biofilmes, avaliando a eficiência de processos de desinfecção (Romanova et al., 2007). O ensaio de bioluminescência tem como base a produção de adenosina trifosfato, ATP, a partir do pressuposto de que a molécula é produzida por todos os seres vivos. A sua presença é decorrente de processos de oxidação de glicose, ácidos graxos e aminoácidos. O ATP pode ser detectado por reação de bioluminescência que ocorre entre a luciferina e a enzima luciferase. A quantidade de ATP está relacionada à intensidade de luz emitida captada por luminômetro, fluorímetro ou espectrofotômetro de cintilação líquida (Macedo, 2000).

O método Ágar vermelho congo é também utilizado para estudo de biofilmes. Este método avalia a capacidade do micro-organismo de produzir cápsula como fator potencial para o desenvolvimento de biofilme (Jain & Agarwal, 2009). O método foi descrito por Freeman et al (1989), que demonstrou ser um método rápido, sensível e reproduzível.

Para avaliar a produção de biofilme por *Staphylococcus* sp. isolados de catéter e hemocultura Antunes et al (2007) empregaram o método Ágar vermelho congo. O modelo utilizado pelos pesquisadores mostrou ser prático e de fácil execução ao detectar presença de cápsula produzida pela bactéria.

Existe ainda o método chamado Método Robbins que, segundo Lewis (2001), é baseado num sistema de fluxo onde percorre uma suspensão bacteriana que banha cupons destacáveis que servem de suporte para deposição do biofilme. Após a formação do biofilme, o fluxo do inóculo é substituído por fluxo contendo meio de cultura e compostos definidos para o teste e o sistema é incubado. Os cupons são retirados e banhados após o período de incubação e submetidos a sonicação para avaliação do biofilme.

### **3.7 Procedimentos usuais no controle de infecção**

As canetas odontológicas, por serem objetos que entram em contato com secreções da cavidade bucal e serem utilizados em procedimentos invasivos, ou seja, que penetram em mucosa, tecidos sub-epiteliais e vasos, precisam passar por processos de desinfecção e esterilização para sua reutilização (Ferreira et al., 2001; Anders, 2006).

O processo de desinfecção compreende a ação de agentes químicos que são recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) (Anexo 10.1), controlados por legislação específica através da Portaria nº 15 - MS de 1988. Além disso, instituições de relevância na odontologia como a ADA e o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC-USA), entre outras, aconselham a prática de medidas de controle de infecção para reduzir os riscos de transmissão de micro-organismos (ADA, 1992; CDC, 2003; Brasil, 1994, 2006). Inúmeras substâncias tais como ácido peracético, glutaraldeído, álcool e detergente enzimático, entre outras, têm sido utilizadas na rotina de consultórios para promover a desinfecção/esterilização nas superfícies e favorecer a remoção de biofilme formado na caneta odontológica. Esses compostos geralmente são aprovados em testes de suspensão e de diluição de uso e são realizados dentro das condições indicadas pelos fabricantes (Green, 1993; Gibson et al., 1999; Andrade et al., 2002; Meyer, 2003; Svidzinski et al., 2007; Sá, 2007).

Os desinfetantes são classificados de acordo com seu espectro de ação, em níveis de atividade alto, intermediário e baixo (Anexos 10.1 e 10.2). Os de alto nível devem garantir a eliminação de alguns esporos, o bacilo da tuberculose e de todas as bactérias vegetativas, fungos e vírus. Os desinfetantes de médio nível não possuem ação contra esporos, mas atuam contra bactérias vegetativas, incluindo as micobactérias e fungos. Desinfetantes de baixo nível atuam contra alguns tipos de fungos, vírus e bactérias, porém não agem contra micobactérias nem esporos (Pedroso, 2004).

Fatores físicos e químicos como a temperatura e o pH podem degradar biocidas (Gaylarde, 1995).

Entre os diversos processos físicos de esterilização destaca-se a esterilização pelo calor que abrange o calor seco formado por estufa e o calor úmido produzido por autoclave. Este é o mais recomendado por apresentar resultados mais confiáveis em relação a outros métodos utilizados. A utilização do método que envolve o calor seco possui a desvantagem de alterar a têmpera do instrumento devido às altas temperaturas atingidas neste processo que chegam a ser superiores a 170°C, (Dabionline, 2003).

O MS (1994) recomenda a autoclavação como método de primeira escolha para esterilização de artigos termorresistentes, embora alguns estudos verifiquem a avaria do instrumental provocada pela corrosão, uma vez que o princípio do método se baseia na formação de vapor de água sob pressão (Ferreira et al., 2001; Whitworth et al., 2004).

Até há algum tempo não era possível esterilizar as canetas odontológicas por processos utilizando-se calor, pois a natureza do material era inapropriada para este procedimento. Porém hoje, os fabricantes fornecem canetas que podem ser submetidas à esterilização por calor sem serem danificadas. As canetas representam um dos meios que favorece a contaminação no consultório odontológico, sendo fundamental a sua autoclavação (Dabionline, 2003).

Os tratamentos aplicados aos artigos odontológicos, após o seu uso, seguem etapas de limpeza e secagem previamente à desinfecção/esterilização e estão de acordo com o Anexo 10.3.

### 3.7.1 Lavagem ultra-sônica

É comum o uso de equipamentos geradores de ultra-som conhecidos como lavadoras ultra-sônicas para a realização de limpeza em instrumentos odontológicos (Pedroso, 2004). Os banhos de ultra-som funcionam geralmente entre 9000 e 100.000 ciclos por segundo e removem sujidades aderidas à caneta odontológica por processo chamado de cavitação (Anders, 2006). A cavitação é um evento físico de formação e colapso de microbolhas de gás em um líquido. As bolhas se expandem e implodem. Esse colapso gera áreas de pressão negativa que alteram a pressão ao redor do micro-organismo, destruindo-o. Assim, o efeito em micro-organismos está associado ao rompimento da membrana plasmática, à despolimerização de compostos e a quebras nas moléculas de DNA (Sá, 2007). Deve-se ter o cuidado da temperatura da solução não exceder a 55°C durante a limpeza ultra-sônica para não evitar a cavitação (Parashos, 2004). Outros fatores que podem interferir na resposta do ultra-som incluem a morfologia e o tamanho da célula bem como a sua estrutura de superfície (Sá, 2007). A opção por métodos automatizados para realizar a limpeza dos equipamentos, garante maior eficiência e segurança ao manipulador quando comparado a métodos de limpeza manual (Whitworth et al., 2004; Anders, 2006). Porém, estudo realizado por Bagg et al. (2007) mostrou que este método é freqüentemente usado em conjunto com a limpeza manual.

Além disso, o ultra-som tem sido utilizado como tratamento coadjuvante na remoção de biofilme, ao aumentar a eficácia dos desinfetantes (Meyer, 2003). Durante lavagens ultra-sônicas, porém, não é recomendada à adição de

desinfetantes, pois seu uso pode resultar na fixação de proteínas no instrumental. Em contrapartida, detergentes podem ser adicionados durante tratamento ultra-sônico tendo como destaque, em levantamento realizado por Bagg et al. (2007), o uso de detergente enzimático.

O ultra-som não é considerado método esterilizante. Uma das razões é que as cavitações formadas no interior da cuba são variáveis na sua distribuição. Portanto, seu efeito na célula também é variável.

Em razão da dificuldade de medir a eficácia do processo de limpeza, especialistas recomendam que sejam realizados testes que certifiquem a eficácia de lavadoras ultra-sônica durante a sua instalação e semanalmente através de teste de erosão, utilizando película de alumínio (Bagg et al., 2007).

### **3.7.2 Detergente enzimático**

Os detergentes de uma maneira geral podem ser definidos como compostos capazes de reduzir a tensão superficial entre regiões de caráter polar e apolar que estão em contato e facilitar a limpeza. Por se constituírem de uma região polar e outra apolar, conseguem desorganizar os fosfolipídios da membrana celular.

O tratamento com detergente enzimático tem sido inovador e é recomendado para processo de limpeza de artigos odontológicos (Pedroso, 2004). Em sua composição há basicamente enzimas como proteases, lípases e amilases de pH neutro que reduzem a sujidade por ação sobre a matéria orgânica degradando proteínas, lipídeos e carboidratos, respectivamente, e removendo seus resquícios da superfície do instrumental (Alfa & Jackson, 2001; Pedroso,

2004). Alguns estudos mostram que a associação do detergente enzimático a outras técnicas de limpeza, tais como escovação e banhos ultra-sônicos, apresentam melhor eficiência (Whitworth et al., 2004; Sesma et al., 2005; Bagg et al., 2007).

### **3.7.3 Glutaraldeído**

O Glutaraldeído, também conhecido como 1,5 – pentanedial; 1,3-diformylpropano; Glutaral; dialdeído glutárico, é um composto que em seu estado natural revela-se ácido enquanto que em solução alcalina, após a adição de bicarbonato de sódio, configura um agente microbicida. Usualmente é encontrado em solução aquosa a 50% e, após diluição, é comercializado como esterilizante e desinfetante em concentrações a 2%. Com relação ao seu espectro de ação possui atividade bactericida, virucida, fungicida e esporicida. Seu mecanismo de ação é devido à alquilação de grupos sulfidríla, hidroxila, carboxila e amino dos micro-organismos, alterando seu DNA, RNA e conseqüentemente a síntese de proteínas (Denyer, 1995). A ação esporicida, segundo protocolo de uso de glutaraldeído elaborado pela Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional (ACPO), se deve ao fato da substância reagir com a superfície do esporo, provocando o endurecimento das camadas externas e eliminação do esporo (ACPO, 2004).

O glutaraldeído é utilizado em processos de desinfecção/esterilização, sendo considerado um dos agentes mais aplicados na rotina odontológica. Quando os objetos são imersos em glutaraldeído 2% por um período de 20 a 30 minutos obtém-se a desinfecção de nível alto. A esterilização química do material,

no entanto, somente é obtida quando esta imersão ocorre no período de 8 a 10 horas. Após ativação com agente alcalinizante, o glutaraldeído passa a ter validade que pode variar entre 14 e 28 dias, apresentando compatibilidade com ligas metálicas (Pedroso, 2004; ACPO, 2004; Brasil, 2006).

Um aspecto importante quanto à manipulação do glutaraldeído é que a exposição aguda ou crônica a este agente pode causar irritação na pele, olhos e sistema respiratório. Contato com a solução pode causar sensibilização da pele, levando às dermatites de contato. A inalação de glutaraldeído resulta em danos aos tecidos do trato respiratório superior. Segundo a ACPO (2004) o glutaraldeído, o formaldeído e o acetaldeído são aldeídos reativos com baixo peso molecular e possuem propriedades químicas similares. Entretanto, a mutagenicidade do glutaraldeído parece ser maior que a do formaldeído, evidenciada principalmente na produção de ligações cruzadas na proteína do DNA. Em razão dos efeitos deletérios causados pela exposição desse agente, o ácido peracético tem sido proposto como alternativa ao uso de alquilantes incluindo o glutaraldeído (Müller et al., 2001). Além disso, como medida preventiva, o MS (2001) preconiza o uso de equipamentos de proteção durante a manipulação do glutaraldeído. Atualmente, a utilização de glutaraldeído, em estabelecimentos assistenciais de saúde, ainda é assegurada por legislação como a Portaria Federal nº. 15/88, que entre outras exigências estabelece a obrigatoriedade do Registro como “saneante de uso hospitalar”, emitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

#### **3.7.4 Álcool 70%**

O álcool é um composto químico constituído por grupo hidroxila, -OH, ligado a um radical alquila. O agente, também conhecido como etanol, pode ser obtido a partir da reação de compostos alqueno, halogenetos de alquila, cetonas, ésteres, aldeídos, entre outros. O álcool é um agente químico utilizado nos processos de anti-sepsia e desinfecção de objetos e superfícies. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado à desnaturação de proteínas, desorganização da membrana plasmática e desidratação. Seu espectro de ação se estende à atividade antimicrobiana contra bactérias (incluindo micobactérias), fungos filamentosos e leveduras, vírus (especialmente os envelopados). Também é considerado tuberculocida mas não possui atividade contra esporos (Sá, 2007). A ação germicida do álcool é quase imediata à temperatura ambiente, sendo o pH ideal em torno de 5,5 a 5,9.

Para aumentar a sua atividade germicida, o álcool costuma ser diluído a 70% em água, embora sua ação se estenda entre 20 a 90%. O grau de hidratação é um fator de destaque para sua atividade (Andrade et al., 2002; Sá, 2007).

Em revisão realizada por Andrade et al. (2002), os autores descrevem que concentrações do desinfetante preparadas por peso (p/p) possuem ação mais eficaz que concentrações preparadas por volume (p/v). Os mesmos autores concluem ainda que a seleção de um germicida pressupõe conhecimento amplo do espectro de ação, dos princípios físico-químicos, das indicações e contra indicações de uso, dos micro-organismos potencialmente envolvidos, dos fatores que interferem na ação germicida, incluindo aqueles relacionados ao equipamento, além da toxicidade e da regulamentação governamental.

Entre os fatores que podem interferir na atividade microbiana do álcool está a presença de matéria orgânica, tipo e nível de contaminação, resistência intrínseca do micro-organismo, concentração, tempo de exposição ao agente desinfetante, característica do material ou tipo de atividade, temperatura e pH (Andrade et al., 2002).

### **3.7.5 Ácido peracético.**

O ácido peracético é um composto químico formado por ácido acético ou anidrido acético e o peróxido de hidrogênio. O agente, também conhecido como ácido peroxiacético ou peróxido de ácido acético, no comércio é apresentado na forma de uma mistura em equilíbrio, contendo peróxido de hidrogênio, ácido acético e um agente estabilizador (Srebernich, 2007; Caixeta, 2008). Segundo Rosado (2009) a reação geralmente ocorre em presença de ácido sulfúrico como catalisador.

O ácido peracético é um composto químico utilizado nos processos de desinfecção/esterilização. O mecanismo de ação do agente parece ocorrer por oxidação dos componentes celulares (Sá, 2007). O ácido peracético é considerado de amplo espectro de ação com efeito bactericida, fungicida, virucida e esporocida. O desinfetante apresenta a vantagem de permanecer ativo na presença de matéria orgânica além de não produzir compostos tóxicos ou carcinogênicos, uma vez que não reage com proteínas (Kitis, 2003; Souza & Daniel, 2005). Além disso, apresenta baixo impacto ambiental por ser um composto biodegradável. O ácido peracético pode ser decomposto em temperaturas próximas a 45°C, tendo como temperatura ótima de ação 25°C. Sua

validade é de 30 dias após ser misturado com o inibidor de corrosão e de 1 ano a contar de sua fabricação (Svidzinski et al., 2007). No entanto, possui baixa estabilidade ao armazenamento e apresenta ainda um custo elevado. Por não ser irritante à pele e às mucosas, não danificar equipamentos médico-odontológicos nas concentrações usadas, o ácido peracético tem sido recomendado (Sá, 2007).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção dos micro-organismos para os ensaios**

Foram obtidos para os ensaios *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 junto ao Laboratório 164 de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia-ICBS-UFRGS. Utilizou-se também isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* sp. e *S. epidermidis* ATCC 35984 como micro-organismos controle para avaliação de produção de biofilme. Estes últimos foram obtidos da coleção de bactérias mantidas no Laboratório de Ensino do mesmo departamento. As bactérias foram mantidas em meio sólido de Ágar nutriente a 4°C distribuído em tubos de ensaio inclinados. Os micro-organismos foram inoculados em Ágar triptona de soja e incubados por um período de 24 horas a 37°C, a fim de se obter as amostras para os ensaios.

#### **4.1.1 Meios de cultivo**

Para o cultivo bacteriano utilizaram-se os meios Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), Ágar Triptona de soja (TSA), Caldo Triptona de Soja (TSB) obtidos comercialmente. A composição dos meios está descrita no Anexo 10.4 e a preparação dos mesmos no Anexo 10.5. Após seu preparo, a solução foi acondicionada em frasco de vidro e esterilizada em autoclave durante 15 min a 121°C. Após a esterilização, os meios foram mantidos em frascos a 4°C até o momento da sua utilização ou distribuídos em placas de Petri.

#### **4.1.2 Avaliação do crescimento dos micro-organismos**

A avaliação do perfil de crescimento dos micro-organismos foi realizada através de curvas de crescimento para cada bactéria individualmente. Nesse

ensaio, uma suspensão de bactérias foi inicialmente preparada a partir do cultivo prévio em TSA. Essa suspensão foi preparada da seguinte forma: com uma alça esterilizada, foi transferida uma alíquota bacteriana do meio TSA para um tubo contendo 1 mL de caldo BHI. Essa suspensão foi inoculada em 100 mL de caldo BHI contidos em frasco de vidro de capacidade de 500 mL e incubada por 26 horas a 30°C sob agitação branda, de aproximadamente 50 rpm. Na seqüência, foram efetuadas leituras das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro ANALISER 500M e realizadas contagens das unidades formadoras de colônia. Para isso, a cada intervalo de 90 min, uma alíquota da suspensão bacteriana foi retirada, homogeneizada em agitador de tubos e dispensada em um tubo de leitura para a determinação da absorbância. As leituras foram realizadas utilizando-se filtro 520 nm. As diluições foram efetuadas de acordo com a linearidade das leituras.

Para determinar o número de células viáveis, uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana foi diluída à razão de 10, sucessivamente, até obtenção de diluições que variaram de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  de modo a se obter um número de colônias que ficasse entre 30 e 300 colônias considerado valor válido para a contagem em placa. As transferências foram realizadas com pipetas estéreis em ambiente asséptico. Das diluições de interesse, foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L que foram inoculadas em duplicata em placas contendo meio TSA e incubadas por 24 horas a 37°C.

## **4.2 Avaliação da formação de biofilme**

### **4.2.1 Testes de viabilidade**

#### **4.2.1.1 Avaliação da produção de cápsula**

A avaliação da capacidade de *P. aeruginosa* e *S. aureus* em produzir cápsula como teste presuntivo para a formação de biofilme foi realizada pelo método de semeadura em Ágar Vermelho Congo (AVC), descrito por Freeman et al. (1989), com algumas modificações. O Vermelho Congo foi utilizado como indicador de mudança de pH, apresentando coloração preta em intervalos de pH entre 3,0 e 5,2. O AVC foi preparado a partir de 37 g/L de caldo de BHI, 50 g/L sacarose, 15 g/L Ágar base e 0,8 g/L Vermelho Congo. A autoclavação do Vermelho Congo ocorreu separadamente em solução aquosa concentrada. Após essa etapa, o corante foi adicionado aos demais componentes do meio logo que atingiram uma temperatura de aproximadamente 55°C. Imediatamente após o procedimento de transferência do Vermelho Congo aos demais componentes, o meio AVC foi vertido em placas de Petri. Colônias de *P. aeruginosa* e *S. aureus* obtidas do crescimento em TSA previamente incubadas por 24h a 37°C foram inoculadas por picada em meio AVC a 37°C por 24h. Para avaliação da coloração das colônias foram consideradas como amostras produtoras de cápsula, aquelas que apresentavam colônias pretas. As amostras que apresentaram colônias com cores vermelhas foram consideradas sem a capacidade de produzir cápsula. Como controle positivo foi utilizado o micro-organismo *K. pneumoniae* e como controle negativo, o micro-organismo *Citrobacter sp.*

#### **4.2.1.2 Avaliação da produção de biofilme pelo Método Cristal Violeta**

As bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram avaliadas previamente quanto à capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno através do

método de Cristal Violeta descrito por Christensen (1989), com modificações. Para este ensaio foram preparados 200 mL de meio TSB suplementado com 1% de glicose. Foi preparado um inóculo padronizado pela escala de Mc Farland no valor de 0,5, correspondente a 8 Log de ufc/mL. Para tanto, as bactérias foram cultivadas em TSA a 37°C no dia anterior e adicionadas a 9 mL de água destilada estéril. Após esta etapa, alíquotas de 20 µL do inóculo foram adicionadas a 180µL de caldo TSB e transferidas aos poços de uma placa de microtitulação de polietiestireno. Cada micro-organismo a ser testado ocupou 32 poços da placa. Além disso, no controle negativo foram transferidas alíquotas de 200 µL de caldo TSB a oito poços da placa. No controle positivo um inóculo de 20 µL de suspensão de *S. epidermidis* foi adicionado a 180 µL de TSB em outros oito poços da placa. Após o preenchimento de todos os poços, a suspensão foi incubada a 37°C por 24 horas.

Decorrido este período, o excesso da suspensão bacteriana foi removido e a placa foi lavada três vezes com 200µl de solução salina. Na seqüência foi realizada a fixação das células à placa, utilizando-se 150µL de metanol 100% durante 20min. Após a etapa de fixação, as placas foram invertidas e deixadas a secar ao ambiente por 24horas.

Posteriormente, as placas foram coradas com 150µL de cristal violeta a 0,5% por 15 minutos. O excesso do corante foi removido por sucessivas lavagens em água corrente até que não fosse mais possível observar resquícios do corante na lavagem. Na etapa seguinte, foram adicionados 150µL de etanol 95% durante

30min para suspender novamente as células aderidas ao fundo da placa e efetuar a leitura da absorbância.

A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura de cada poço utilizando-se leitor de placas ADAP Versão 1.6 e o valor médio dos poços foi calculado, após 32 repetições do teste. A leitura da absorbância foi realizada em filtro de 620nm. Foram utilizadas como controle positivo amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984. O ponto de corte (*cut-off*) corresponde ao valor médio das absorbâncias do controle negativo somado a três desvios-padrão.

Para interpretação dos dados foram considerados os valores da leitura de absorbância de acordo com a equação de Stepanovic et al. (2007) mostrada na

Figura 3.

$A \leq A.c$	=	Não produz (N P)
$A.c < A \leq (2 \times A.c)$	=	Fraca (f)
$(2 \times A.c) < A \leq (4 \times A.c)$	=	Moderada (M)
$(4 \times A.c) < A$	=	Forte (F)

**FIGURA 3.** Equação de Stepanovic et al. (2007) aplicadas para interpretação das absorbâncias obtidas pelo MCV. (A) Absorbância. (A.c) Absorbância de Corte.

#### 4.2.2 Avaliação da produção de biofilme em superfície de alumínio

Foram realizados ensaios prévios que demonstraram a capacidade de *P. aeruginosa* e *S. aureus* formar biofilme em superfície de placas de alumínio de 1 x 1cm. Esses resultados indicaram fortemente a possibilidade de formação de biofilme por esses micro-organismos em canetas odontológicas, fabricadas com o mesmo tipo de material. Na seqüência, foram feitos testes de adesão em corpo de prova de canetas odontológicas.

##### 4.2.2.1 Condições de cultivo

Amostras de *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram inoculadas individualmente em placas contendo TSA e incubadas por um período de 24 horas a 37°C, a fim de se obter colônias isoladas. Para induzir biofilme, foi necessário preparar os cupons, o inóculo e caldo BHI em frascos Erlenmeyer de 500 mL.

#### **4.2.2.2 Preparação dos cupons**

Um total de 24 cupons de alumínio retangulares apresentando dimensões de 1 x 1cm foi obtido a partir do corte de canetas odontológicas. Os cupons, antes de serem usados para a formação do biofilme, foram limpos e descontaminados individualmente com acetona pura, lavados com água destilada e finalmente limpos e secos com álcool 70%. Após esta etapa os cupons foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min, em condições semelhantes às indicadas para esterilização de canetas odontológicas, e transferidos com pinça estéril para um frasco de 500mL contendo 100mL de caldo BHI (Parizzi, 2004).

#### **4.2.2.3 Preparação do inóculo**

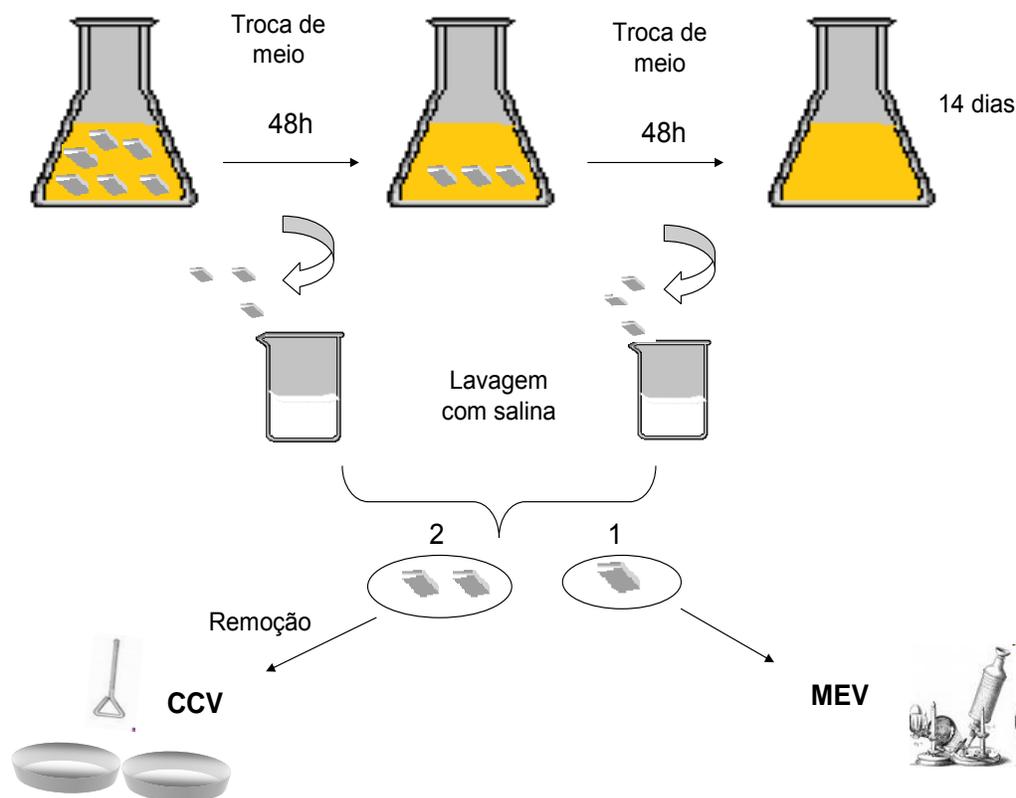
Uma alíquota de colônias cultivadas previamente em TSA, foi adicionada a 100mL de caldo BHI e incubada sob agitação branda a 30°C por 6 horas, período estabelecido previamente por curvas de crescimento. A cada 30 min foram retirados 2 mL e realizadas medidas da absorbância até atingir a concentração correspondente a 7 Log de unidades formadora de colônia (UFC) por mililitro da solução. Após isso, 1 mL da suspensão foi transferida a 99 mL de caldo BHI para se obter um inóculo inicial de 5 Log de ufc/mL. Para o cálculo do inóculo foi utilizada a fórmula descrita no anexo 10.6.

#### **4.2.2.4 Indução de biofilme *in vitro***

O inóculo foi transferido ao frasco de 500 mL contendo 100 mL de BHI. Os cupons foram imersos no meio contendo a suspensão bacteriana com o auxílio de uma pinça longa estéril e foram incubados a 30°C, sob agitação contínua de 50 rpm pelo período de 14 dias.

Durante o período do experimento, a cada 2 dias os cupons foram transferidos para um novo meio nutriente BHI, sendo lavados previamente com solução salina para remoção de células planctônicas. A cada transferência dos cupons, foram retirados do frasco 03 cupons, sendo que 02 deles foram destinados à quantificação de células viáveis aderidas naquele período e o outro cupom, para o preparo e avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

(Figura 4)



**FIGURA 4.** Cupons inseridos inicialmente em frasco contendo suspensão de bactérias em BHI foram a cada 48 h retirados e lavados em solução salina e submetidos a medidas de contagens e microscopia eletrônica de varredura. O meio BHI foi trocado a cada 48 h durante 14 dias.

#### **4.2.2.5 Quantificação de bactérias aderidas**

O número de bactérias aderidas à superfície do cupom foi aferido de acordo com as seguintes etapas: o cupom, após ser retirado do meio nutriente, foi lavado brevemente em solução salina para remoção de células planctônicas (Figura 4). Em seguida, o biofilme foi removido da superfície do cupom com auxílio de um suabe, o qual foi imerso em tubo contendo 2 mL de água destilada estéril e submetido à agitação por “vortex” durante 2 minutos. O cupom foi adicionado ao tubo contendo a suspensão e novamente foi submetido ao “vortex” por 1 minuto para remover o restante do biofilme. Após, o cupom foi descartado. Posteriormente, foi retirado do tubo 1 mL da suspensão obtida e diluída à razão 10 até obtenção de diluições decimais adequadas às contagens pelo método CBV. As etapas foram realizadas com uso de pipetas com ponteiros estéreis. De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L que foram inoculadas em meio TSA e incubadas por 24 horas a 37°C. Foram realizadas contagens em duplicata. O número de células aderidas à superfície do cupom foi expresso em UFC/cm<sup>2</sup> da área de adesão. A fórmula utilizada para as contagens está descrita no Anexo 10.7.

#### **4.2.2.6 Avaliação da adesão por Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para avaliar a distribuição bacteriana na superfície dos cupons e formação de biofilme foi realizada a MEV. As amostras foram preparadas de acordo com o método preconizado por Castro (2002) com algumas modificações. Assim, os cupons após serem retirados da suspensão foram lavados em solução salina por 1 minuto. Posteriormente, foram fixados em glutaraldeído 1% por um período

mínimo de 12 horas. Após a fixação, os materiais foram imersos em etanol para desidratação. A imersão ocorreu em concentrações crescentes de etanol 50%, 70%, 80%, 95% e 100%, intercalando-se 20 (vinte) minutos a cada troca. Ao final da desidratação, as amostras foram imersas em acetona 100% e submetidas à metalização em ouro utilizando-se o equipamento Metalizador Sputter Coater Bal-Tec SDC 050. Os cupons foram observados ao microscópio eletrônico JEOL SCANNING MICROSCOPE - JSM 6060.

### **4.3 Análise de canetas odontológicas**

#### **4.3.1 Superfície externa**

Além dos ensaios em cupons cortados de canetas odontológicas foi realizada também análise da microbiota presente em canetas odontológicas íntegras, após seu uso em procedimentos odontológicos. Para isso, foi realizada coleta de material residual por suabe em superfície externa de 12 canetas odontológicas recém utilizadas nesses procedimentos. As coletas foram realizadas após 1, 2 e 24 horas do seu uso. Um grupo de 6 canetas foi lavado com solução salina por 15 s e outro grupo restante não foi submetido à lavagem. Após a coleta, as amostras foram imediatamente processadas em laboratório de acordo com o Anexo 10.8.

#### **4.3.2 Superfície interna**

Nesse experimento também foram coletadas amostras da superfície interna de cupons obtidos a partir do corte de caneta odontológica em desuso, ou seja, de tempo de uso indeterminado. As amostras foram coletadas por raspagem e incubadas previamente em caldo BHI por 24 e 48 h a 37°C. Posteriormente, foi

realizada a identificação de aeróbios em todas as amostras. Foi realizada MEV de cupons dessas canetas.

#### **4.4 Isolamento e identificação dos micro-organismos**

A fim de se obter micro-organismos isolados, todo material coletado foi inoculadas em meio nutriente TSA, ágar sangue e agar Mac Conkey e incubados por 24, 48h e 7 dias a 37°C. Para a identificação dos isolados foram realizadas coloração de Gram e testes complementares de identificação (Anexo 10.9). A morfologia da colônia e sua característica fenotípica em relação ao meio diferencial também foram consideradas na identificação.

Bactérias Gram-positivas foram identificadas utilizando-se prova da catalase, prova da coagulase e coloração verde malaquita. Os testes utilizados para identificação de bactérias Gram-negativas foram TSI, utilização do citrato de sódio, oxidase, meio SIM (que indica a produção de H<sub>2</sub>S, Indol e motilidade), hidrólise da uréia e fenilalanina-desaminase, de acordo com MacFaddin (2000).

#### **4.5 Tratamentos para a remoção do biofilme**

Para remoção dos biofilmes diferentes tratamentos foram utilizados. Para tanto os produtos detergente enzimático, ácido peracético, glutaraldeído, álcool 70%, solução salina e lavagem ultra-sônica foram utilizados. As concentrações dos agentes utilizados e os tempos de exposição das amostras aos tratamentos estão de acordo com os dados mostrados na Tabela 1 preconizados pela agência nacional de vigilância sanitária.

**TABELA 1.** Concentração e tempo de exposição dos agentes químicos utilizados para remoção de biofilmes das canetas odontológicas. (Fonte: Brasil, 2006)

<b>Tratamentos</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Tempo de imersão (min)</b>
Glutaraldeído	2	20
Ácido peracético	0,2	10
Álcool	70	10
Detergente enzimático	0,04	5
Solução salina	0,9	10
Lavagem ultra-sônica	*	5

\* Não aplicável

#### **4.5.1 Preparo das soluções**

Primeiramente foram preparadas soluções ativas antimicrobianas, que seguiram rigorosamente protocolos descritos pelos fabricantes. Para cada biocida foram preparados 50 mL de solução ativa.

Para o preparo do detergente enzimático 4 mL/L, uma alíquota de 200 µL da solução estoque foi adicionada a 49,8 mL de água destilada estéril. No preparo do glutaraldeído 2%, um volume de 4 mL da solução 25% foi adicionado a 46 mL de água destilada estéril. Para ativação do ácido peracético 0,2% foi adicionado o ativador antioxidante adquirido comercialmente à solução estoque. O álcool 70%

foi preparado a partir da adição de 35 mL de álcool absoluto a 15mL de água destilada estéril. A solução salina 0,9% foi adquirida comercialmente e não exigiu preparo. As soluções ativas foram dispensadas em placa estéril de poliestireno contendo 6 poços, onde foram realizados os tratamentos. A cada poço da placa foram adicionados 7 mL do agente ativo.

A manipulação dos compostos envolvidos nos ensaios foi realizada em câmara de fluxo laminar e com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), de acordo com as normas de biossegurança (Brasil, 2006).

#### **4.5.2 Exposição aos tratamentos**

A imersão nos biocidas foi efetuada após 14 dias de incubação dos cupons para produção de biofilme, sendo os tratamentos aplicados de acordo com os manuais de recomendação e com as diretrizes estabelecidas pelos órgãos competentes tais como Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Secretaria Municipal de Saúde, Conselho regional de odontologia, Conselho Federal de Odontologia, Associação Americana de Odontologia, Associação Britânica de Odontologia entre outros. Para cada agente ativo foram testados 3 cupons.

A exposição aos tratamentos foi realizada de acordo com as seguintes etapas: após ser retirado do frasco contendo caldo nutritivo, os cupons foram imersos em solução salina por 1min para breve lavagem e transferidos para os poços da placa de poliestireno contendo o agente químico. O tempo de imersão do cupom na solução ativa dependeu do tipo de tratamento (Tabela 1). Após a exposição da amostra ao agente removedor, os cupons foram novamente lavados

em solução salina por 1 min para redução residual do composto e das células planctônicas. A seguir, 2 cupons foram separados para a quantificação bacteriana e 1 cupom foi destinado ao preparo para avaliação por MEV.

Para, verificar a eficiência do tratamento, foi utilizado suabe para a remoção das bactérias ainda aderidas ao cupom. O suabe foi imerso em tubo contendo 2 mL de água destilada estéril e submetido à agitação por “vortex” durante 2 min para desprendimento das bactérias. Na seqüência, o cupom também foi submetido ao “vortex” por 1 min. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas à razão 10 da suspensão obtida do tratamento até a obtenção de diluições adequadas para a contagem das unidades formadoras de colônia.

Alíquotas de 100  $\mu$ L a partir das diluições foram inoculadas em placas contendo meio TSA e incubadas por 24h a 37°C. Foram, então, realizadas contagens em duplicata. O cálculo das unidades formadoras de colônia foi efetuado de acordo com a equação descrita por Chaves (2004) em Anexo 10.7.

Cupons que não foram submetidos ao tratamento estabeleceram o parâmetro inicial do número de células aderidas, servindo como controles. A partir da diferença nas contagens verificada entre cupons tratados e cupons não tratados foi possível verificar a eficiência dos diferentes tratamentos aplicados ao biofilme.

O efeito dos tratamentos sobre o biofilme na superfície dos cupons também foi avaliado por MEV. Decorrido o tempo de imersão dos cupons nas soluções de tratamento, estes foram lavados em solução salina por 1 minuto e preparados individualmente para MEV de acordo com método preconizado por Castro (2002)

e referido no item (3.2.2.6). Os cupons não submetidos ao tratamento, após serem retirados do meio nutritivo, também foram brevemente lavados e preparados para MEV.

#### **4.5.2.1 Lavagem ultra-sônica**

Antes de submeter o cupom ao tratamento de lavagem ultra-sônica, o equipamento ultra-sônico foi testado para verificar a presença da atividade ultra-sônica. O teste consistiu na imersão de uma película de alumínio em líquido acondicionado na cuba do equipamento em funcionamento durante 1 minuto. A atividade ultra-sônica é verificada visualmente quando, após 1 minuto, a película de alumínio é avariada por pequenas perfurações em sua superfície (técnica de controle de qualidade utilizada no Centro de Perícias Médicas do Tribunal de Contas do Rio Grande do Sul).

Em relação ao tratamento, o cupom após ser retirado do frasco contendo caldo nutritivo foi imerso em solução salina por 1min para uma breve lavagem e transferido para um tubo contendo 3 mL de água destilada estéril. Posteriormente, o tubo contendo o cupom foi submetido à lavagem ultra-sônica durante 5 minutos a uma frequência aproximada de 40 kHz em lavadora ultra-sônica. Após a exposição da amostra ao tratamento, o cupom foi retirado e lavado brevemente em solução salina para remoção de células planctônicas. A seguir, 2 cupons foram separados para a quantificação das bactérias remanescentes e 1 cupom foi destinado ao preparo e avaliação por MEV. A remoção das bactérias aderidas para efetuar as contagens bem como o preparo dos cupons para obter imagens

por MEV foram efetuados de forma semelhante aos demais tratamentos já descritos anteriormente.

A eficiência da lavagem ultra-sônica foi avaliada quantitativamente pela contagem de bactérias viáveis a partir da diferença nas contagens verificadas entre cupons tratados e cupons não tratados e, qualitativamente, pelas imagens obtidas por MEV. Os dados numéricos foram analisados estatisticamente.

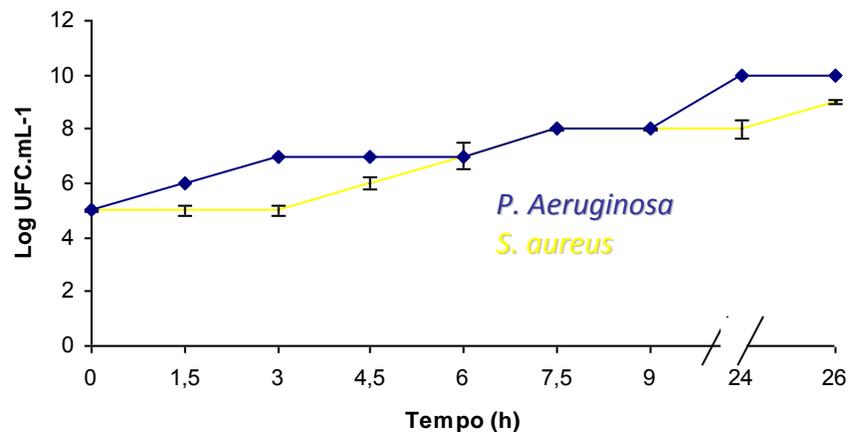
#### **4.6 Análise estatística**

Cada experimento foi repetido no mínimo 4 vezes para cada tratamento com as bactérias estudadas e os dados obtidos nos testes foram submetidos à análise estatística usando-se o modelo “oneway ANOVA” do programa SSPS. Foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, para verificar a diferença entre as médias. Os níveis de significância estatística foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Curvas de crescimento

O crescimento de *P. aeruginosa* e *S.aureus* foi demonstrado nas curvas de crescimento (Figura 5). A cada intervalo regular de tempo foram medidas as absorbâncias e realizadas as contagens de unidades formadoras de colônia. A curva de crescimento contribuiu para calcular o inóculo inicial utilizado na seqüência do experimento.



**FIGURA 5.** Curvas de crescimento de *P. aeruginosa* e *S. aureus* expressas em UFC.mL.<sup>-1</sup>, obtidas por cultivo em caldo BHI, a 37°C sob agitação constante.

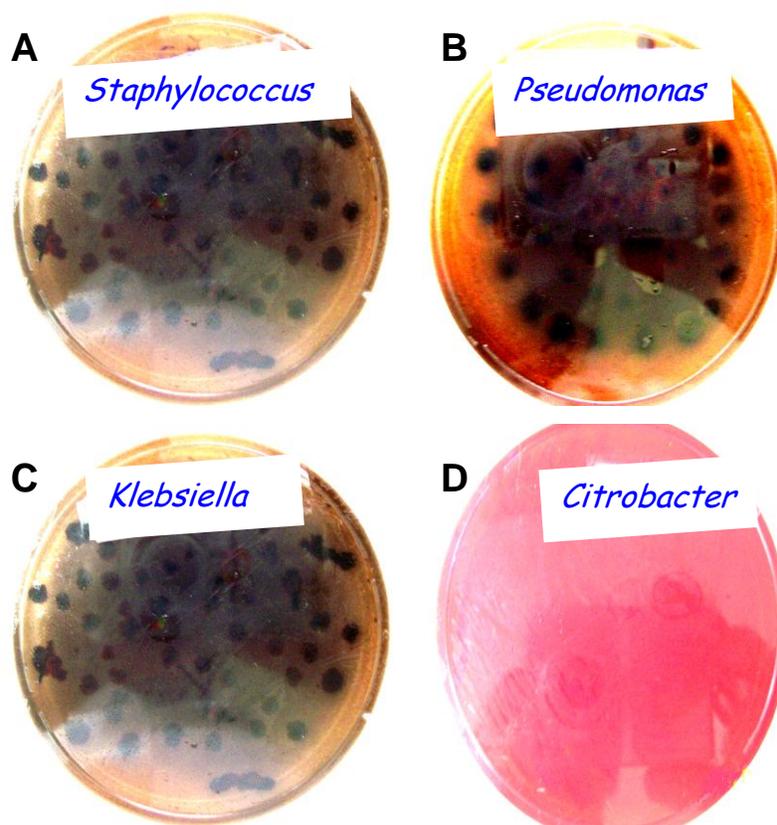
As bactérias testadas apresentaram um perfil de crescimento semelhante, porém, em relação a uma curva de crescimento típica em que cada fase é bem caracterizada, não foram observadas as fases *lag* e exponencial, pois o inóculo inicial partiu de 5 Log UFC/ mL.

Em relação à fase estacionária desses micro-organismos, esta pode ter sido desencadeada pela depleção de nutrientes e/ou a possível produção de metabólitos.

No que se refere à fase de declínio deste ciclo de crescimento, não foi possível observá-la durante o período de incubação de 26 horas.

## **5.2 Avaliação da produção de biofilme pelo método Vermelho Congo**

A formação de cápsula foi demonstrada pelo método Vermelho Congo. As bactérias que produziram cápsula apresentaram uma coloração escura no meio ágar vermelho congo (Figura 6).



**FIGURA 6.** Método Vermelho Congo para verificar a produção de cápsula. (A) *S. aureus* produtor de cápsula. (B) *P. aeruginosa* produtor de cápsula (C) *Klebsiella* (controle positivo): colônias negras e rugosas. (D) *Citrobacter* (controle negativo): colônias vermelhas e lisas.

### 5.3 Avaliação da produção de biofilme pelo método Cristal Violeta

Os resultados que se referem à capacidade de formação de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno pelo método CV são mostrados nas Tabelas 2 e 3. O valor médio das absorvâncias de cada poço foi calculado, após as 32 repetições do teste. Como controle positivo foi utilizado *S. epidermidis* ATCC

35984. A formação de biofilme sobre a placa ocorreu em todas as amostras, com intensidades que variaram de moderada a forte.

**TABELA 2.** Valores médios de absorvância das amostras de *P.aeruginosa* e *S. aureus* obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método de Cristal Violeta.

Repetições	C-	C+	<i>Pseudomonas</i>				<i>Staphylococcus</i>			
1	0,007	0,548	0,08	0,102	0,103	0,089	0,249	0,31	0,239	0,25
2	0,01	0,499	0,09	0,098	0,113	0,11	0,228	0,25	0,269	0,26
3	0,008	0,531	0,11	0,126	0,112	0,1	0,247	0,22	0,272	0,23
4	0,009	0,562	0,09	0,099	0,107	0,112	0,294	0,27	0,253	0,35
5	0,011	0,575	0,1	0,1	0,113	0,108	0,214	0,22	0,314	0,24
6	0,013	0,477	0,11	0,093	0,115	0,098	0,252	0,32	0,28	0,28
7	0,009	0,529	0,1	0,12	0,101	0,102	0,406	0,24	0,505	0,27
8	0,01	0,588	0,09	0,101	0,098	0,106	0,469	0,42	0,266	0,31

(C-) Controle negativo

(C+) Controle positivo

**TABELA 3.** Formação de biofilme após a interpretação dos valores de absorvância de acordo com a equação de Stepanovic et al. (2007) (Figura 3).

Repetições	C-	C+	<i>Pseudomonas</i>				<i>Staphylococcus</i>			
1	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
2	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
3	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
4	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
5	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
6	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
7	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F
8	NP	F	M	M	M	M	F	F	F	F

(C-) Controle negativo

(NP) Não produz

(F) Forte

(M) Moderado

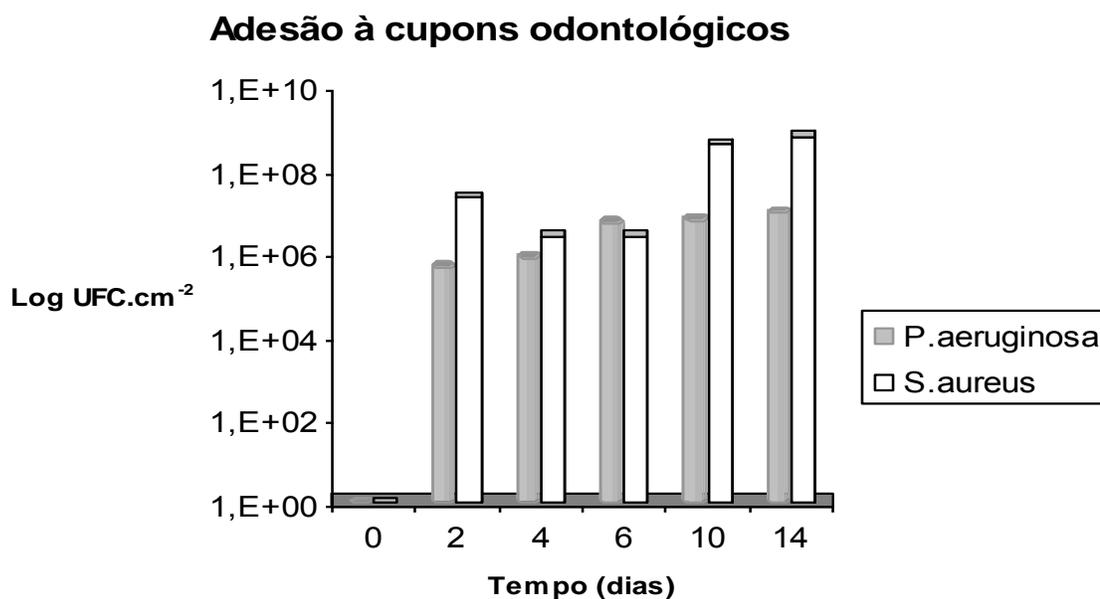
(C+) Controle positivo

#### 5.4 Produção de biofilme *in vitro* em superfície de alumínio

Para verificar a produção de biofilme foram realizados testes de adesão em corpos de prova de canetas odontológicas.

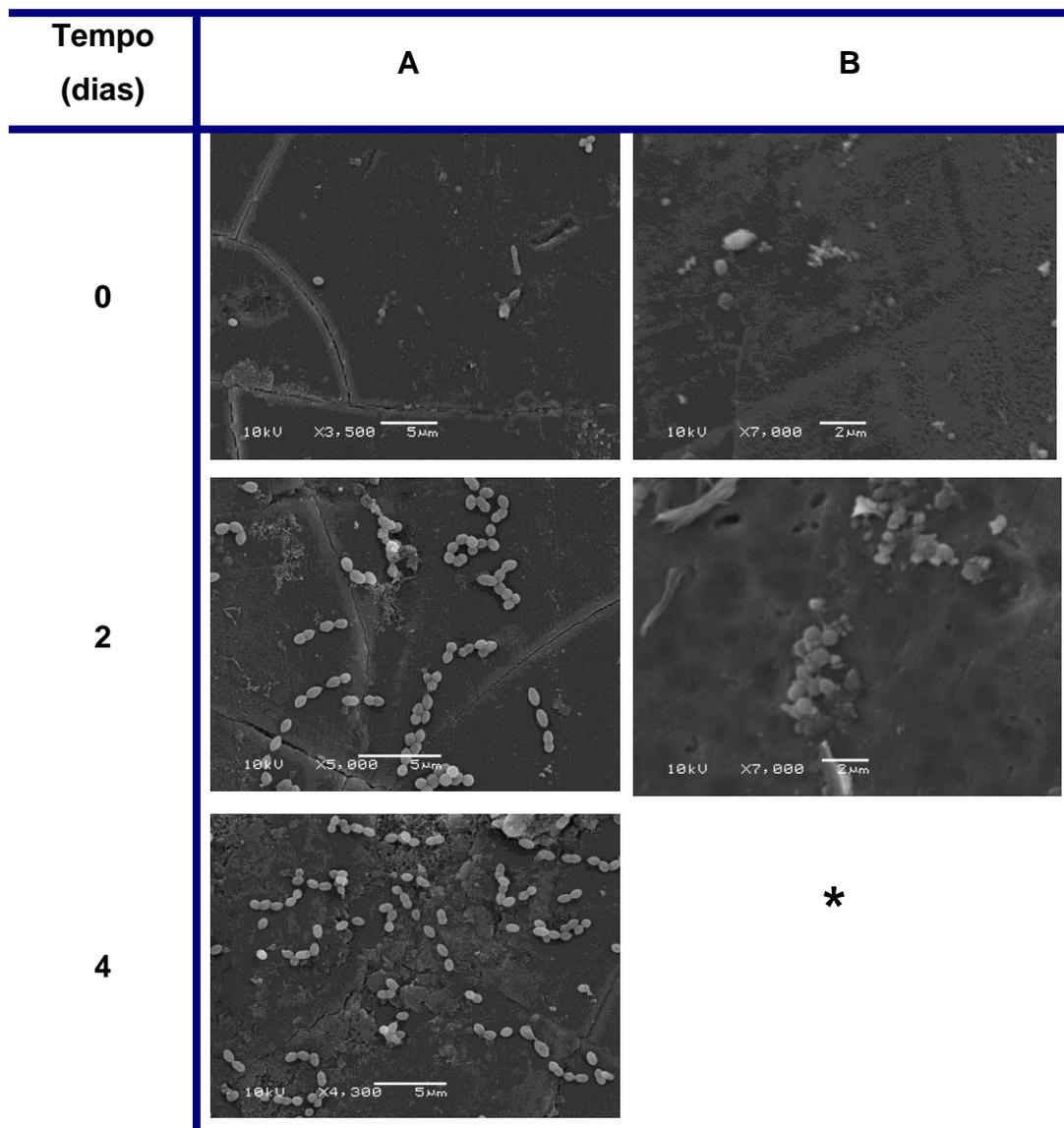
Ao avaliar a capacidade de adesão ao cupom, ao longo da incubação, foi possível estabelecer o período de formação do biofilme mais adequado para submeter os cupons aos tratamentos.

A adesão dos micro-organismos ao cupom ao longo da incubação foi avaliada pela contagem de células viáveis e por MEV, sendo os resultados demonstrados nas Figuras 7 e 8. A partir desses resultados, foi utilizado o tempo de 14 dias de incubação para a produção de biofilme.



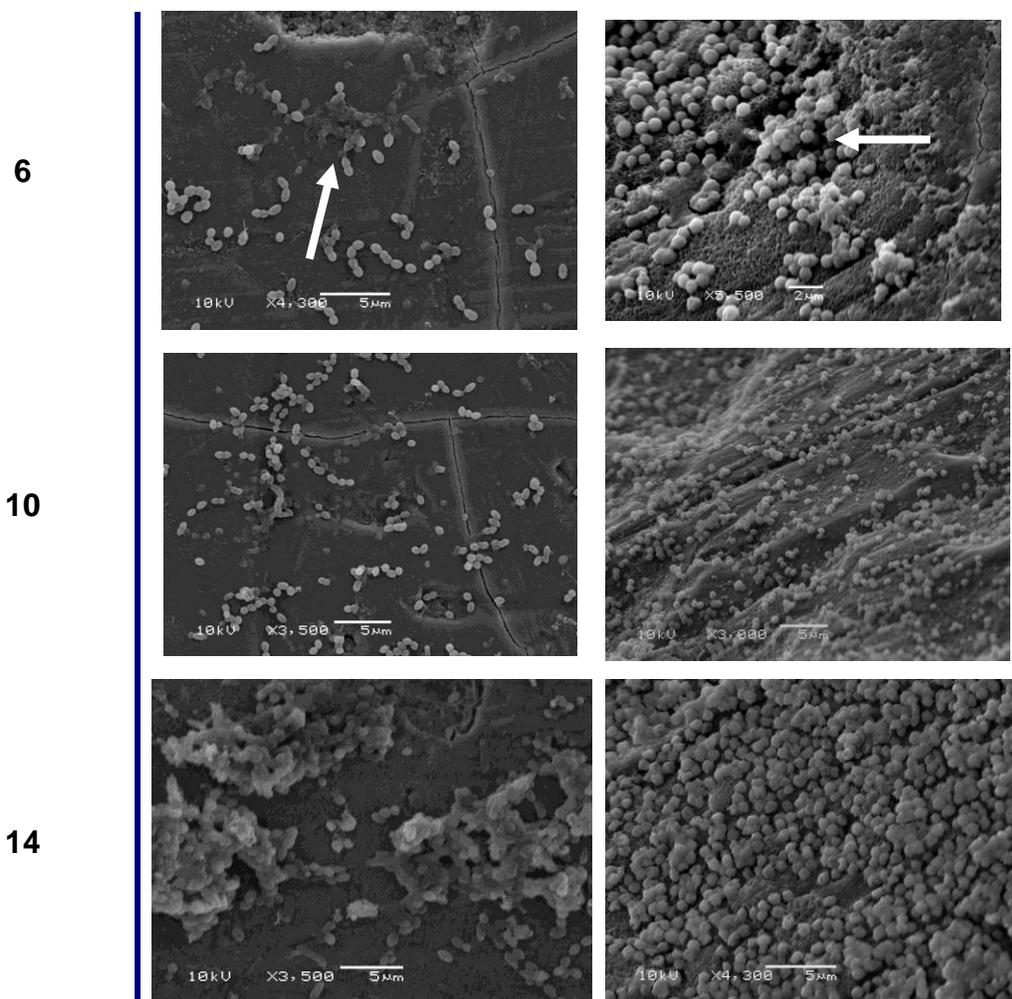
**FIGURA 7.** Avaliação da adesão *in vitro* de *P. aeruginosa* e *S. aureus* a cupons de alumínio, expressa em unidades formadoras de colônia durante 14 dias de incubação.

Na Figura 8 são mostradas micrografias obtidas por MEV de superfície de cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas. Pode-se observar que com o aumento do tempo de incubação houve maior adesão das bactérias aos cupons. No controle negativo, não houve crescimento de micro-organismos (resultado não mostrado).



**FIGURA 8.** Fotomicrografias mostrando a adesão bacteriana a cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em diferentes tempos de incubação. A coluna **A** indica as fotomicrografias referentes a *P. aeruginosa*. A coluna **B** representa as fotomicrografias referentes a *S. aureus*. As setas mostram estruturas sugestivas de matriz polimérica \* não foi possível obter fotomicrografias do cupom referente a *S. aureus* no quarto dia de incubação. No controle negativo, não houve crescimento de micro-organismos (resultados não mostrados)

Continuação



**FIGURA 8.** Fotomicrografias mostrando a adesão bacteriana a cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, em diferentes tempos de incubação. A coluna **A** indica as fotomicrografias referentes a *P. aeruginosa*. A coluna **B** representa as fotomicrografias referentes a *S. aureus*. As setas mostram estruturas sugestivas de matriz polimérica \* não foi possível obter fotomicrografias do cupom referente a *S. aureus* no quarto dia de incubação. No controle negativo, não houve crescimento de micro-organismos (resultados não mostrados)

### 5.5 Tratamentos dos cupons

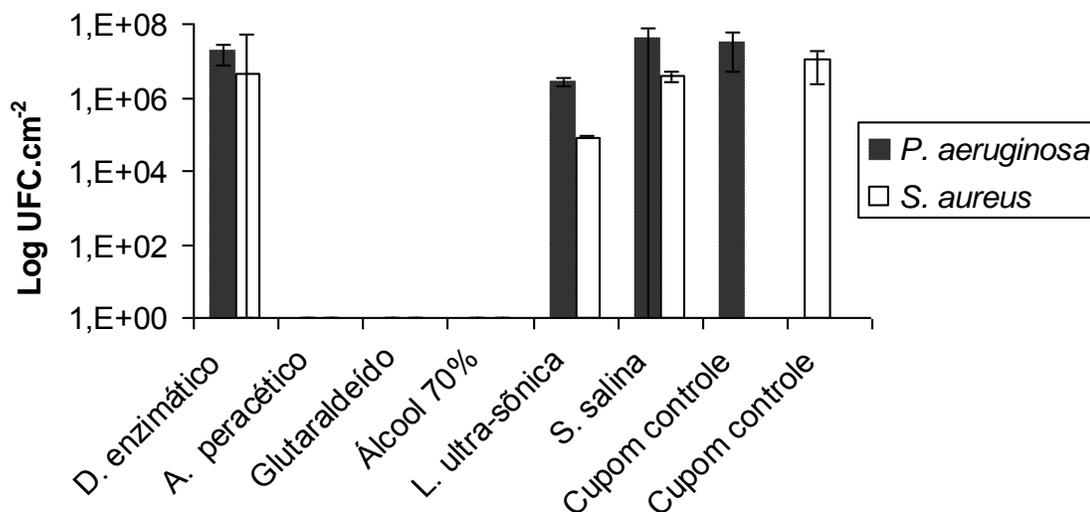
Os tratamentos com diferentes agentes foram avaliados por contagens de bactérias viáveis e por MEV, sendo os resultados mostrados nas Figuras 9, 10 e na Tabela 4.

Cupons utilizados como controles, que não foram submetidos ao tratamento, estabeleceram o parâmetro inicial do número de bactérias aderidas

O número de bactérias removidas dos cupons tratados com ácido peracético, glutaraldeído e álcool 70% foi maior do que os tratados com detergente enzimático, lavagem ultra-sônica e solução salina tendo variações significativas entre esses dois grupos de tratamentos em *P. aeruginosa*. O efeito dos tratamentos em *S.aureus* foi similar ao de *P. aeruginosa* exceto a lavagem ultra-sônica que demonstrou melhor desempenho em *S.aureus*. A eficiência dos tratamentos utilizando-se ácido peracético, glutaraldeído e álcool foram equivalentes entre si, pois não houve diferença significativa nas variações de células removidas entre esses biocidas.

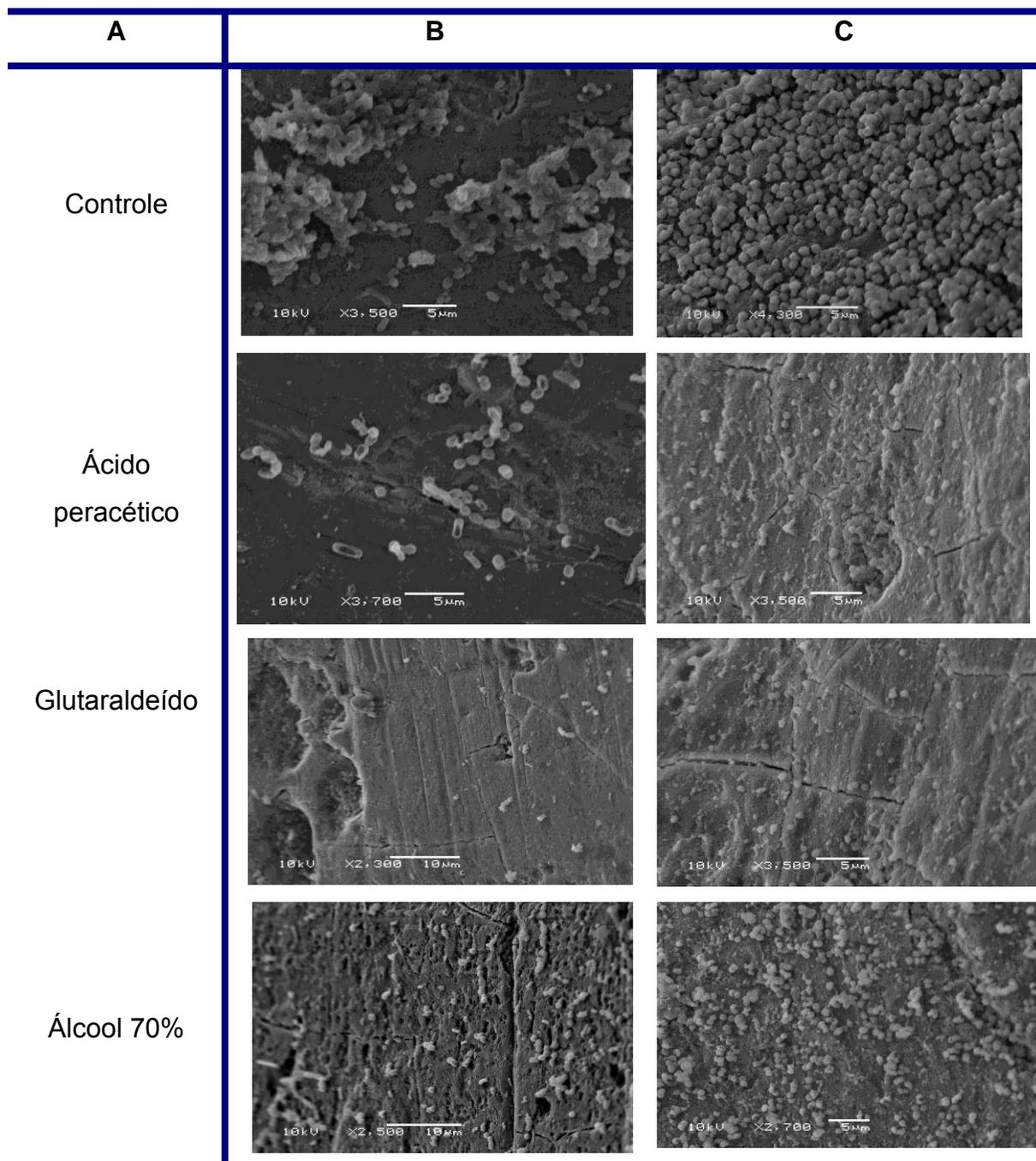
**TABELA 4.** Comparação entre o número de bactérias aderidas de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* obtidos por contagem de bactérias viáveis de cupons tratados e cupons não tratados e o nível de significância.

Tratamentos	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>		
	Não tratados	Tratados	Valor P	Não tratados	Tratados	Valor P
Detergente enzimático	3E+07	2E+07	0,182	1E+07	4E+06	0,25
Ácido peracético	3E+07	0	0,008	1E+07	0	0,006
Glutaraldeído	3E+07	0	0,008	1E+07	0	0,006
Álcool 70%	3E+07	0	0,008	1E+07	0	0,006
Lavagem ultra-sônica	3E+07	3E+06	0,11	1E+07	1E+05	0,001
Solução. salina	3E+07	4E+07	0,639	1E+07	4E+06	0,16



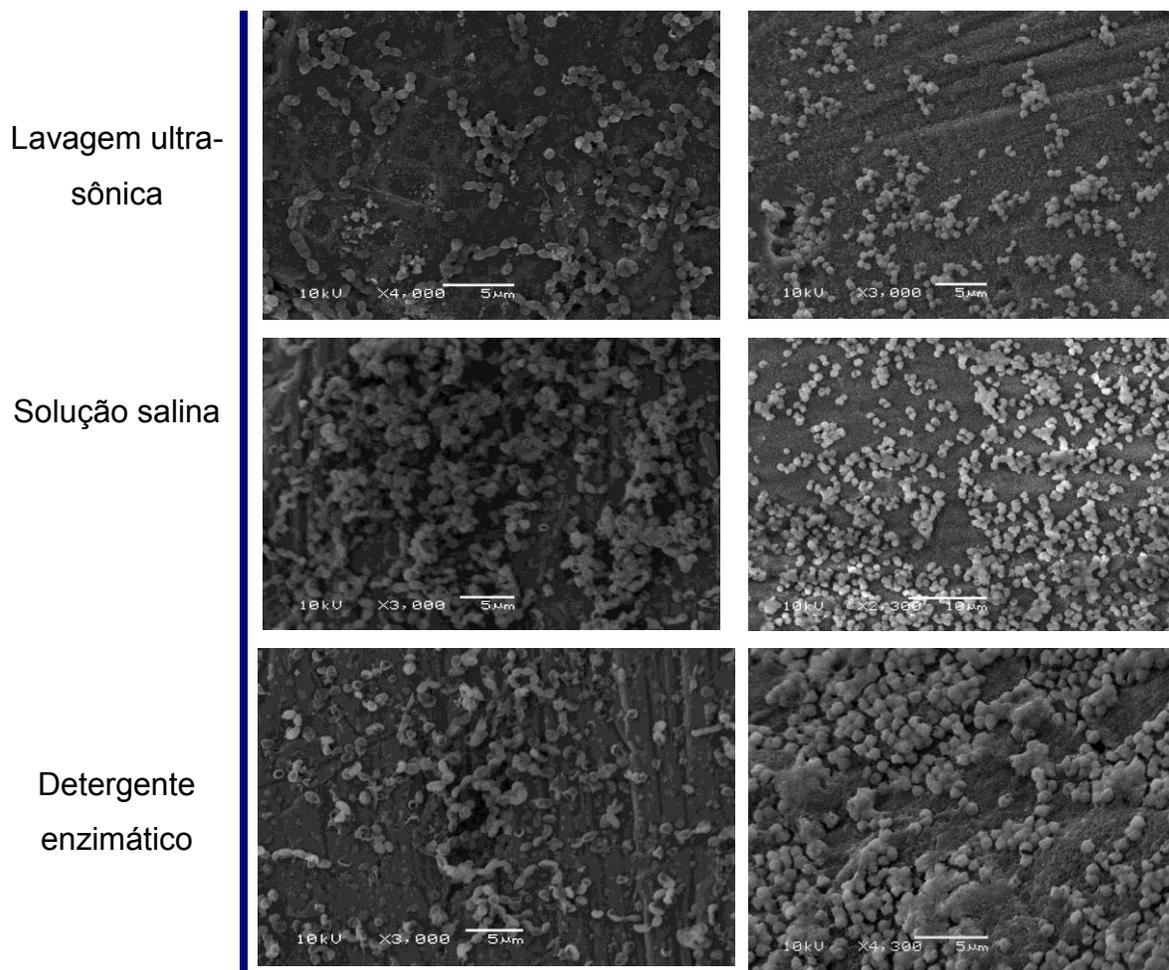
**FIGURA 9.** Número de células aderidas ao cupom após a aplicação dos tratamentos em *P. aeruginosa* e *S. aureus* expressos em unidades formadoras de colônia.

Na Figura 10 são mostradas micrografias MEV de biofilme tratados após 14 dias de incubação sobre cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas. Pode-se observar a presença de bactérias mesmo após os tratamentos.



**FIGURA 10.** Fotomicrografias (MEV) mostrando a adesão bacteriana a cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas obtidas após os tratamentos para remoção de biofilme formado em 14 dias de incubação. A coluna **A** representa os tratamentos aplicados. A coluna **B** é referente a *P. aeruginosa*. A coluna **C** é referente a *S. aureus*.

Continuação



**FIGURA 10.** Fotomicrografias (MEV) mostrando a adesão bacteriana a cupons de alumínio provenientes de canetas odontológicas obtidos após os tratamentos para remoção de biofilme formado em 14 dias de incubação. A coluna **A** representa os tratamentos aplicados. A coluna **B** é referente a *P. aeruginosa*. A coluna **C** é referente a *S. aureus*.

## 5.6 Análise de canetas odontológicas manipuladas

## 5.7 Identificação dos micro-organismos

**TABELA 5.** Testes de identificação para cocos Gram positivos a partir de amostras coletadas por suabe da superfície de canetas odontológicas após a sua utilização.

<b>Testes</b>	<b>Cocos Gram Positivos</b>
TSA (triagem)	pos
Ágar sangue	pos
Catalase	pos
Coagulase	pos
Hemólise	pos

**TABELA 6.** Testes de identificação para bacilos Gram positivos a partir de amostras coletadas por suabe da superfície de canetas odontológicas após a sua utilização.

<b>Testes</b>	<b>Bacilos Gram Positivos</b>
TSA (triagem)	pos
Ágar sangue	pos
Catalase	pos
Coloração Verde malaquita	pos
Motilidade	pos
Hemólise	pos

**TABELA 7.** Testes de identificação para bacilos Gram negativos a partir de amostras coletadas por suabe da superfície de canetas odontológicas após a sua utilização.

Testes	Bacilos Gram Negativos
TSA (triagem)	pos
Ágar sangue	pos
Ágar macConkey	pos
Oxidase	pos
Fermentação de glicose	neg
Fermentação de lactose	neg
Produção de sulfeto de hidrogenio	neg
Motilidade	pos
Produção de gás	neg

Os micro-organismos isolados do material residual coletado na superfície externa das canetas odontológicas manipuladas, após 1, 2 e 24 h dos procedimentos odontológicos, estão apresentados na Tabela 8.

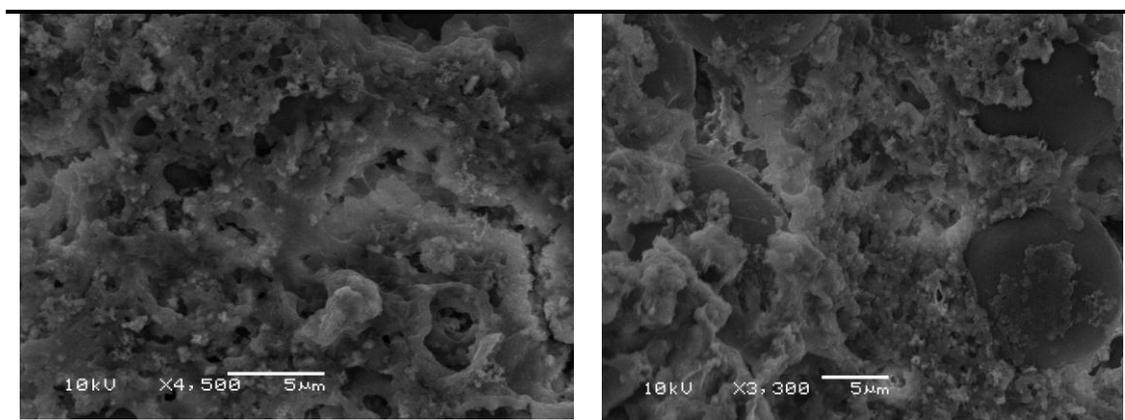
**TABELA 8.** Bactérias isoladas da superfície de 13 canetas odontológicas com ou sem lavagem prévia à coleta em tempos diferentes de uso. Para cada tempo foram testados um total de 4 canetas, sendo 2 canetas com lavagem prévia e 2 canetas sem lavagem prévia.

Tempo (h)	Canetas com lavagem	Canetas sem lavagem
1	01 <i>Staphylococcus sp</i>	*
2	*	01 <i>Staphylococcus sp</i> 01 Bacilo Gram-positivo 01 <i>Staphylococcus sp</i>
24	*	*
Indeterminado	03 Bacilos Gram-positivos 01 Bacilo Gram-negativo	*
<b>Total de canetas</b>	<b>7</b>	<b>6</b>

\* Não houve isolamento

Na amostra que se refere à superfície interna de cupons obtidos a partir do corte de canetas odontológicas que foram manipuladas em tempo de uso indeterminados foram identificados bacilos Gram-positivos produtores de esporos e bacilo Gram-negativo não fermentador, sugestivo de *P. aeruginosa* pela sua característica morfológica colonial. O crescimento dos micro-organismos ocorreu nas primeiras 24 horas.

As imagens obtidas por MEV desse material mostram a presença de uma estrutura amorfa compatível com óxido de alumínio, que se forma espontaneamente na superfície quando esta é exposta ao ar. Não é descartada, no entanto, a presença de biofilme.



**FIGURA 11.** Fotomicrografias da superfície interna de caneta odontológica de tempo de uso indeterminado, por microscopia eletrônica de varredura.

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1 Escolha dos micro-organismos**

A razão da escolha de *P. aeruginosa* e *S. aureus* se deve ao fato destes micro-organismos apresentarem grande capacidade para formação de biofilme e estarem freqüentemente presentes em ambientes úmidos e, especialmente *Pseudomonas*, nos circuitos de água em sistemas odontológicos.

### **6.2 Avaliação da formação de biofilme**

#### **6.2.1 Método Ágar Congo Vermelho**

O método Ágar vermelho congo geralmente é empregado para avaliar vários aspectos relacionados ao biofilme. O método avalia a produção de cápsula, o potencial do micro-organismo de produzir biofilme, o grau de patogenicidade de um isolado, além de avaliar diferentes métodos testados para detecção de biofilme (Jain & Agarwal, 2009).

Neste estudo foi demonstrado que *P. aeruginosa* e *S. aureus* produziram cápsula (Figura 6), como evidenciado pela coloração preta no Ágar vermelho congo. Ao detectar a produção de cápsula, o método forneceu informações válidas neste trabalho, pois revelou uma característica que está associada ao processo de adesão, em uma etapa que antecedeu a indução de biofilme sobre cupons odontológicos.

Jain & Agarwal (2009), ao verificar a acurácia do método AVC, usou como critério a relação entre produção de cápsula e produção de biofilme como fator de virulência, comparando-o com o método da placa de microtitulação. Utilizando isolados comensais e isolados invasivos, os autores demonstraram que o método

apresentou grande sensibilidade na detecção de produção de biofilme por *S. aureus*. Em nosso estudo todos os micro-organismos que formaram cápsula, também formaram biofilme.

No entanto, em estudo realizado por Locatelli et al. (2004) não foi possível estabelecer relação entre a produção de cápsula e adesão bacteriana em material de polimetilmetacrilato e silicone, embora todos os micro-organismos testados produzissem biofilme neste material. Esses dados reforçam a hipótese de que a interação entre o micro-organismo e a superfície do material envolve múltiplos fatores estando, nesse sentido, de acordo com estudos realizados por diferentes autores (Bott, 1993; Jefferson, 2004; Rode et al., 2007) entre outros que avaliaram a adesão bacteriana sob diferentes aspectos como temperatura pH, nutrientes, velocidade de escoamento etc.

Em um outro estudo, realizado por Antunes et al. (2007) foi avaliada a produção de cápsula por *Staphylococcus* sp. Seus resultados demonstraram uma prevalência de 57% dos isolados para a produção de cápsula. As condições do ensaio foram semelhantes as do nosso estudo, embora os pesquisadores tenham utilizado um tempo de incubação mais extenso para confirmação daquelas colônias que exibiram tonalidade intermediária nas primeiras 48 horas. Em nossos experimentos, não foi necessário prolongar o tempo de incubação porque todas as colônias exibiram uma tonalidade preta nas primeiras 24h de incubação.

### **6.2.2 Método Cristal Violeta**

Em nosso modelo, o uso do MCV forneceu informações prévias dos micro-organismos sobre sua adesão a uma superfície abiótica. De acordo com este

método, houve produção de biofilme pelos micro-organismos testados (Tabelas 2 e 3).

Stepanovic et al. (2007) relataram que existem dificuldades na interpretação dos dados obtidos por este método. Os mesmos autores afirmam que o valor de corte para a interpretação dos resultados, tem sido calculado de diferentes formas: alguns pesquisadores utilizam valores de três desvio-padrão acima do controle negativo. Outros, adotam valores pré-definidos de 0,1 ou 0,12 ou 0,2. Valores como o dobro do valor do controle negativo também têm sido usados como ponto de corte, assim como valores do controle positivo configuram um parâmetro para formação de biofilme. Portanto, sem a padronização do método, os pesquisadores adotavam critérios distintos para interpretação dos resultados. Para minimizar essa dificuldade, Stepanovic et al. (2007) elaboraram um protocolo para padronizar as etapas de execução da técnica, bem como a análise de seus resultados. Segundo os autores, para interpretação dos dados é necessário saber o valor médio das absorbâncias da amostra e o valor médio das absorbâncias do controle negativo. O ponto de corte (*cut-off*) corresponde ao valor médio das absorbâncias do controle negativo somado a três desvios-padrão. Com esses dois valores é possível verificar a formação de biofilme inserindo os dados na equação de Stepanovic et al. (2007) demonstrada na Figura 3.

Em nosso experimento, os dados obtidos por este método demonstram que *P. aeruginosa* e *S. aureus* formaram biofilme sobre a placa de microtitulação (Tabela 3). Além disso, foi possível constatar que a adesão de *P. aeruginosa* à superfície foi significativamente menor que a adesão exibida por *S. aureus* (Tabela

2). Peeters et al. (2008), em um estudo experimental, compararam vários métodos de detecção de biofilme em microplacas de titulação, incluindo o MCV. Os pesquisadores testaram vários micro-organismos incluindo *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Burkholderia cenocepacia* e *Propionibacterium acnes*. Os valores de absorvância foram lidos em 590nm, porém para interpretação dos valores das absorvâncias, adotaram critério diferente do padronizado por Stepanovic et al. (2007). Qualitativamente, os resultados foram comparáveis aos do nosso estudo, pois todos micro-organismos produziram biofilme e notadamente *P. aeruginosa*, que exibiu menor adesão em relação aos outros micro-organismos.

Uma possível explicação da menor adesão de *P. aeruginosa* se deve à composição da sua matriz ser extremamente hidratada. Essa característica pode ter influenciado a adesão da bactéria durante o período de incubação de 24 horas. Outra explicação é que cepas com características hidrofóbicas tendem a ter melhor adesão às superfícies hidrofóbicas do que às superfícies hidrofílicas.

Em alguns estudos o uso do MCV para avaliação do biofilme envolvendo bactérias Gram-negativas produziu resultados variáveis. Essa variabilidade pode gerar dúvidas aos pesquisadores quando estes realizam a extrapolação dos resultados que foram obtidos *in vitro*, para outras aplicações.

Hentzer et al. (2001), ao verificarem o efeito da superprodução de alginato na estrutura de biofilme, avaliou a adesão de *P. aeruginosa* a placas de microtitulação, utilizando também o MCV. A medida de absorvância de *P. aeruginosa* atingiu valores de absorvância de 0,060. Embora as condições experimentais utilizadas pelos pesquisadores fossem um pouco diferentes em

alguns aspectos em relação à esse estudo como, por exemplo, à temperatura de incubação de 30°C e a leitura da absorbância, ambos estudos obtiveram adesão de *P. aeruginosa* a placas de microtitulação.

Rivas et al (2006) demonstraram, em seus ensaios, não haver correlação entre biofilme formado por MCV e biofilme formado em superfície de aço inox . Os autores utilizaram cepas de *E.coli* patogênica e *E. coli* não patogênica e obtiveram diferentes resultados. A variabilidade dos resultados levou os autores a concluir que o teste não é adequado para estabelecer a correlação entre diferentes superfícies de adesão.

Reisner et al. (2006) revelaram a fraca correlação entre a formação de biofilme e meios diversificados, sugerindo que diferentes cepas de *E. coli* podem responder de forma diferente as mudanças ambientais e que cepas potencialmente produtoras de biofilme contendo fatores de adesão como *pili* e fimbrias, nem sempre produzem mais biofilme em relação a cepas isentas desses fatores. Afirmaram também que a variação na composição do meio pode provocar uma variação na formação do biofilme.

### **6.3 Biofilme em cupom de alumínio**

A curva de crescimento demonstrou o perfil das bactérias testadas neste trabalho e contribuiu para estabelecer o inóculo para indução do biofilme. Foi possível obter um inóculo de 5 Log a partir da transferência de 1 mL da suspensão bacteriana para um frasco contendo 99 mL de BHI. Esta transferência ocorreu na sexta hora de incubação, período no qual os micro-organismos exibem crescimento exponencial representada pela a fase Log na curva de crescimento. A

opção por este inóculo se deve aos estudos que relacionam produção biofilme a densidade de células que desencadeiam o processo de formação. Além disso, os micro-organismos geralmente produzem substâncias poliméricas na fase Log de crescimento.

A análise da formação do biofilme na superfície de alumínio foi realizada quantitativamente por contagens de bactérias viáveis ao longo da incubação e qualitativamente por MEV. Os resultados obtidos pelo método de CBV, nesta etapa de formação de biofilme, foram compatíveis com as imagens captadas por MEV. As imagens demonstraram a adesão entre a bactéria e o cupom de alumínio ao longo do período de incubação (Figura 8). O processo de adesão ocorreu gradualmente, sendo evidenciado pelos valores das contagens de bactérias viáveis realizadas a cada 2 dias até o final da incubação.

A adesão ao cupom tanto de *P. aeruginosa* quanto de *S. aureus* foi observada pelo valor expressivo das contagens obtidas a partir do primeiro dia de mensuração, atingindo ao longo de 14 dias, o valor médio de  $9 \times 10^6$  e  $6 \times 10^8$  UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente (Figuras 7 e 8). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos pelo método Cristal Violeta. Essa maior adesão de *S. aureus* em relação a *P.aeruginosa* poderia ser explicada pela natureza diversa da superfície do material. Bactérias que exibem superfície hidrofóbica tendem a apresentar maior adesão em superfícies com as mesmas características. É possível, no entanto, que a presença de grupos iônicos presentes nessas superfícies alterem a hidrofobicidade, fazendo com que esta característica nem sempre tenha influência predominante no processo de adesão. Locatelli et al.

(2004) em seu estudo demonstraram que *P. aeruginosa* exibiu maior adesão que *S. aureus* tanto em superfícies hidrofóbicas quanto superfícies hidrofílicas.

O início do processo de adesão dos micro-organismos, em nosso estudo, poderia ser atribuído à formação de filme condicionante inicial e também produção de cápsula pelos micro-organismos, uma vez que, freqüentemente esses eventos tem sido precursores constantes da formação de biofilme diversos. Essa idéia já havia sido lançada por Chaves (2008) que ao estudar a cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável, afirmou que a formação do filme condicionante é uma etapa precursora do biofilme, e que esta película se forma pela adsorção das substâncias orgânicas dissolvidas no meio sobre a superfície. Além disso, Marshall et al. (1971) relata que o processo de adesão por glicocálice ocorre na fase de adesão irreversível, considerada uma das etapas iniciais do biofilme. Testes positivos para produção de cápsula, obtidos em nosso experimento, sugerem essa hipótese.

É factível que cargas negativas exibidas por essas bactérias justifiquem também a adesão inicial observada em nossos experimentos. A hipótese é compatível com relato de Melo (2008), ao afirmar que a carga de superfície das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são negativas devido à presença de lipopolissacarídeos e ácidos teicóicos, respectivamente. A adesão inicial por *P. aeruginosa* pode ser explicada ainda pela presença de flagelos que segundo O'Toole & Kolter (1998) estas estruturas conferem mobilidade à bactéria, importante na sua adesão inicial.

Alguns pesquisadores vinculam ao conceito de biofilme o número de bactérias aderidas a uma superfície. Ronner & Wong (1993), Wirtanen et al. (1996,) e Andrade et al. (1998) consideram biofilme a adesão de bactérias na ordem de  $10^5$ ,  $10^3$  e  $10^7$  UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente. Levando-se este critério em consideração, o número de bactérias verificado em nossos experimentos sugere a presença de biofilme após 6 dias de incubação.

Além disso, as imagens da MEV sugerem a formação de biofilme , podendo se observar a presença de substância amorfa envolvendo as bactérias, sugestiva de matriz polimérica. Essas estruturas foram observadas a partir do sexto dia de incubação e estão indicadas pelas setas na Figura 8.

Biofilme está também associado à presença da espécie de micro-organismo envolvida numa matriz polimérica extracelular aderida a uma superfície. A comunicação entre as bactérias inclui a produção de compostos extracelulares que influenciam a expressão de genes responsáveis pelo contato físico das células além de outros fatores (Costerton et al., 1999; Davey & O'Toole, 2000).

Outra observação importante em nosso estudo se refere ao perfil de adesão de *S.aureus* ao longo da incubação. A Figura 7 mostra que houve uma redução da adesão no sexto dia de incubação, retomando seu crescimento gradual nos períodos subseqüentes. Essa oscilação no processo de adesão pode ter ocorrido em razão da produção de substâncias poliméricas como por exemplo alguns polissacarídeos. A formação dessas substâncias pode ter provocado a redução de compostos necessários para o crescimento da bactéria, sendo que a alta atividade metabólica das bactérias poderia ter reduzido a sua taxa de crescimento. Essa

hipótese se assemelha a idéia de Jefferson (2004) que em seu modelo teórico relatou que a glicose possui grande influencia na produção de matriz polimérica e que a falta de nutrientes pode induzir ao desprendimento da bactéria séssil.

Outra hipótese que poderia justificar essa queda na adesão é a possível produção de metabólitos secundários que tenha de alguma forma afetado a adesão temporariamente. Vermelho (2007) sustenta que a produção e o acúmulo de metabólitos secundários tóxicos podem iniciar o processo de morte bacteriana e a desintegração do biofilme.

Em ensaio que avaliou formação de biofilme, Marques et al. (2007) usaram métodos semelhantes (CBV e MEV) aos utilizados em nossos experimentos para a avaliação da adesão. Eles verificaram que *S. aureus* aderiu à superfície de vidro e aço inox sob condições de incubação de 37°C durante 15 dias, atingindo um valor de  $10^8$  UFC.cm<sup>-2</sup>. Embora os resultados tenham sido similares aos encontrados em nosso estudo, não se pode descartar a influência de fatores como temperatura e condição estática no processo de adesão. Diversos estudiosos Bott (1993); Jefferson (2004); Rode et al. (2007), conforme já mencionado no item 5.2.1, consideram a adesão bacteriana um processo multifatorial.

Para estabelecer o período de incubação nesse experimento, testes preliminares foram realizados utilizando-se um período total de 16 dias. Após esses testes, o tempo de incubação adequado para aplicação dos tratamentos foi de 14 dias, pois neste ponto, foi atingido o número máximo de bactérias aderidas, que se manteve constante até o 16° dia.

#### 6.4 Eficiência dos tratamentos para remoção do biofilme

O efeito dos tratamentos sobre o biofilme foi verificado a partir da comparação entre o volume total de bactérias viáveis presentes em biofilme controle e o volume total de bactérias obtidas por CBV em biofilme tratado.

A Tabela 4 mostra que para *P.aeruginosa* os tratamentos envolvendo álcool 70%, glutaraldeído e ácido peracético mostraram-se variáveis em relação ao cupom controle, havendo diferença estatística. Os três biocidas reduziram 7 Log de bactérias viáveis e, entre esses, não houve diferença significativa. O efeito dos tratamentos envolvendo detergente enzimático, solução salina e lavagem ultrassônica em *P.aeruginosa* não foi significativo, portanto, similar ao cupom controle.

Em *S.aureus* os tratamentos envolvendo álcool 70%, glutaraldeído e ácido peracético mostraram-se variáveis em relação ao cupom controle, havendo diferença estatística. Os três biocidas reduziram 7 Log de bactérias viáveis e, entre esses, não houve diferença significativa. O efeito dos tratamentos envolvendo detergente enzimático e solução salina em *S. aureus* não foi significativo, portanto, semelhante em relação ao cupom controle.

O efeito de álcool 70%, glutaraldeído e ácido peracético foi similar entre *P. aeruginosa* e *S. aureus*, provavelmente porque as bactérias sésseis aderidas ao cupom constituíam bactérias vegetativas sensíveis a esses biocidas. Tais agentes, para as condições de atividade utilizadas nestes experimentos, apresentaram espectro de ação contra bactérias vegetativas.

O álcool provavelmente inativou bactérias viáveis, desnaturando proteínas e desorganizando a membrana plasmática além de provocar desidratação. O fato do

álcool estar diluído a 70% de água permitiu a sua entrada na célula, aumentando sua atividade contra células vegetativas aderidas. Esse mecanismo de ação sobre bactérias vegetativas é semelhante ao descrito por Denyer, (1995) e Sá, (2007) em estudo de revisão, embora não deixem claro se há atividade em células aderidas. As condições experimentais de nosso trabalho, como temperatura ambiente e pH próximo à neutralidade, favoreceram a ação do álcool 70% sobre *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Andrade et al., (2002) admitiram como uma vantagem do álcool a sua rápida atividade contra micro-organismos nas condições ambientais semelhantes as descritas em nosso trabalho. No entanto, as fotomicrografias de cupons tratados com álcool 70% em nosso estudo sugerem que não houve uma eliminação total de biofilme (Figura 10). Russo et al. (2000) relataram que a desinfecção de pontas de seringa tríplice recém usadas e contaminadas com microbiota bucal, utilizando-se álcool 70%, é insuficiente para níveis de segurança biológica, embora reduza o número de micro-organismos.

Portanto, baseado nos dados encontrado em nosso trabalho pode-se afirmar que, a aplicação do álcool, nas condições deste experimento, para desinfecção de superfícies com biofilme foi insuficiente.

A redução das bactérias viáveis pelo uso de ácido peracético pode ser explicada pelo seu forte efeito oxidante em grupos sulfidríla, promovendo a desnaturação de proteínas e enzimas importantes nas reações de biossíntese. Os presentes dados sugerem que a provável catalase produzida por *S. aureus* não impediu à ação antimicrobiana do ácido peracético, sendo suscetível.

Alguns pesquisadores testaram a eficiência de ácido peracético em condições experimentais diferentes, inclusive utilizando bactérias planctônicas. Em estudo de Svidzinski et al. (2007) foi avaliada a eficiência de ácido peracético e hipoclorito de sódio utilizando *S. aureus* metilina-resistente. Os resultados mostraram que ambas as soluções exibiram ação bactericida após contato por 5 minutos e suas capacidades bactericidas foram equivalentes. Srebernich, (2007) avaliou a eficiência de ácido peracético e de dióxido de cloro como sanitizantes de hortaliças, utilizando *Salmonella* e *E. coli*. Seus resultados mostraram eficiência em ambos os tratamentos, sendo que o tratamento 100 ppm/15 minutos foi o mais eficiente. Segundo Souza & Daniel (2005) avaliaram eficiência de ácido peracético e hipoclorito de sódio, utilizando *E. coli* e *Clostridium perfringens*, provaram que *C. perfringens* foi mais resistente à ação do biocida que *E. coli*. Sustentaram ainda que o ácido peracético foi eficiente, mesmo na presença de matéria orgânica. Portanto, os diferentes estudos referidos tiveram resultados que demonstraram uma atividade biocida significativa contra células viáveis, sendo neste sentido, compatíveis aos dados do nosso trabalho. Em se tratando de bactérias contidas em biofilme as fotomicrografias de cupons tratados com ácido peracético sugerem que houve uma redução importante de biofilme. No entanto, a presença de algumas estruturas demonstradas na Figura 10 sugere que a sua remoção não foi completa. Nossos resultados estão de acordo com os dados de Marques et al. (2007) que demonstraram a eficiência do ácido peracético em reduzir biofilme em superfície de aço inox e de vidro, porém não removê-lo completamente. No estudo

de Marques et al. (2007) houve redução de 4 e 5 Log de *S. aureus* da superfície de aço e vidro respectivamente.

É possível que a ação do glutaraldeído sobre as bactérias viáveis, ocorra por reações de alquilação em grupos sulfidríla, hidroxila e carboxila, alterando RNA e DNA. Esse mecanismo de ação já havia sido descrito por Denyer (1995) ao avaliar o espectro de ação de vários biocidas incluindo o glutaraldeído bem como as suas atividades. Porém, em estudo de Gonçalves et al. (2002) foi demonstrado que a aplicação intermitente de glutaraldeído em biofilme formado sobre cupons de aço em sistema dinâmico não foi efetiva contra micro-organismos que favorecem a corrosão. Os autores utilizaram 200 ppm do biocida durante 3 horas. Sugeriram, a partir de seus resultados, que se utilize maiores concentrações do biocida bem como um maior tempo de exposição. Em outro estudo, Simões et al. (2009) avaliaram a eficiência de glutaraldeído e CTAB, utilizando *Bacillus cereus* e *P. fluorescens*. Demonstrou-se que *P. fluorescens* foi mais resistente à ação dos biocidas. Seus resultados ainda mostraram que em biofilme formado por ambas bactérias houve maior resistência aos antimicrobianos.

O efeito do detergente enzimático não foi significativo na remoção dos biofilmes formados por *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Seu perfil, nesse estudo, pode estar relacionado ao fato deste não apresentar propriedades descontaminantes e se tratar de um composto elaborado à base de enzimas que removem material orgânico. As enzimas acabam degradando proteínas, lipídeos e carboidratos presentes no substrato, sendo inativos contra as bactérias. Wood et al. (1999) sustentaram que agentes removedores de biofilme não precisam ser

necessariamente antimicrobianos. Entretanto, Johansen et al. (1997), em estudo de modelos de biofilme, notaram que algumas enzimas podem ser bactericidas e não remover biofilme, enquanto outras podem remover biofilme, porém não eliminar as bactérias. Sugerem o uso combinado dessas substâncias para se obter um bom resultado.

Sesma et al. (2005) relatam que o uso de efervescentes enzimáticos combinado com a escovação pode melhorar a ação de limpeza. Schmidt et al. (2008) abordam aspectos relevantes que podem interferir na atividade deste tipo de detergente, como o tempo de imersão dos objetos, o número de enzimas que compõem o detergente e a quantidade de sujidade a ser eliminada. Johansen et al. (1997) testaram a eficiência de enzimas na remoção de modelos de biofilme formados em aço e polipropileno utilizando *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. Os autores relataram que *Staphylococcus* sp. foi mais sensível à remoção enzimática, utilizando Pectinex, do que *Pseudomonas* sp. Eles atribuíram essa diferença às variações na composição da matriz. Portanto, os dados da ação do detergente enzimático em nosso trabalho demonstraram que a sua aplicação individualizada não teve efeito para remoção de biofilme. Mais estudos serão necessários para avaliar se ele poderia ser usado em conjunto com outros agentes para torná-lo eficiente.

O tratamento utilizando lavagem ultra-sônica em *S. aureus* mostrou-se significativo em relação ao cupom controle, reduzindo cerca de 3 Log de bactérias viáveis. A lavagem ultra-sônica nas condições experimentais deste estudo, apresentou menor efeito em relação ao álcool 70, glutaraldeído e ácido peracético,

e maior efeito em relação aos tratamentos com detergente enzimático e solução salina.

O efeito da lavagem ultra-sônica na remoção de biofilme foi diferente nos dois micro-organismos: a ação mecânica provocada por cavitação permitiu a remoção parcial de biofilme formado por *S. aureus*, mas não reduziu de forma significativa biofilme formado por *P. aeruginosa*. Esta diferença pode estar relacionada com os diferentes mecanismos de colonização dos micro-organismos e variações na composição da matriz. É possível que a matriz polimérica produzida por *P. aeruginosa* tenha protegido o biofilme do efeito de cavitação, formando uma barreira física de forma mais consistente que a matriz polimérica produzida por *S. aureus*.

A composição do biofilme é heterogênea, configurando uma estrutura complexa de microcolônias e canais que permitem fluxo de fluidos e nutrientes (Surman et al., 1995).

Rode et al. (2007) quando estudaram a formação de biofilme por *S. aureus* cultivados sobre diferentes condições como temperatura, etanol e concentração de glicose e cloreto de sódio, observaram padrões fenotípicos e genotípicos altamente diversificados na formação de biofilme em *S. aureus*, destacando que é preciso ter cautela antes de tirar conclusões gerais sobre a regulação da formação do biofilme.

Gibson et al., (1999) relataram que a força mecânica aplicada à superfície exerce significativamente influência na remoção do biofilme. Entretanto, Jefferson (2004) em seu estudo afirmou que biofilmes são resistentes à força física e que

organismos dentro de biofilme pode suportar uma série de adversidades como privações de nutriente e variações de pH, além de outras.

A lavagem ultra-sônica tem sido indicado para limpeza interna de equipamentos médico-odontológicos, como aparelhos endoscópicos que são de difícil acesso para a desinfecção manual. É possível que somente a imersão desses equipamentos em biocidas não seja suficiente para remover biofilme preso as suas paredes internas, sendo necessária uma ação mecânica. Em nosso estudo o único tratamento que exerceu ação mecânica foi a lavagem ultra-sônica. O fato deste tratamento ter removido parcialmente o biofilme em cupons de canetas odontológicas, não descarta a hipótese de que o método também possa ser utilizado para removê-lo das paredes internas de canetas usadas na rotina de trabalho. Muitos fabricantes de canetas odontológicas, no entanto, desaconselham o uso desse procedimento em instrumentos a fim de evitar possíveis danos causados pela cavitação na estrutura interna de suas turbinas. Portanto, é necessário que se realizem mais estudos no sentido de ampliar a utilização desse método, melhorando a sua eficiência e minimizando o impacto da lavagem ultra-sônica sobre o sistema de funcionamento das canetas.

A solução salina, embora tenha sido adotada neste estudo como tratamento controle, não é aplicável em estudos de biofilme. Neste experimento, sua aplicação contribuiu para verificar o efeito da ação da solução salina sobre o biofilme imerso durante o período de 10 minutos. Como seria de esperar, não houve influência sobre o desprendimento de bactérias aderidas, fato que também

foi observado quando foi testado o tempo de imersão dos cupons em solução salina.

Os dados obtidos por MEV e pela CBV indicaram que houve redução de biofilme quando se utilizou álcool 70%, glutaraldeído e ácido peracético além de lavagem ultra-sônica em *S. aureus*. Entretanto, se observou pela MEV a presença de bactérias que permaneceram aderidas aos cupons, mesmo após aqueles tratamentos que reduziram significativamente bactérias viáveis. A observação dessas estruturas na superfície sugere que o uso apenas do método CBV para avaliar a remoção de um biofilme é insuficiente, por se tratar de um método indireto e ter como único parâmetro a contagem de bactérias viáveis. A MEV tem sido o método de escolha para avaliar a adesão bacteriana em superfícies abióticas e bióticas em vários estudos (Locatelli et al., 2004; Marques et al., 2007; Chavant et al., 2007; Caixeta, 2008; Rosado, 2009).

Sabe-se que a biomassa de um biofilme não é constituída apenas por bactérias viáveis. Além disso, fragmentos de biofilme podem conter bactérias viáveis em seu interior, comprometendo a segurança biológica principalmente quando se refere a biofilme formado em instrumentos médico-odontológicos. Jefferson (2004) em seu estudo afirmou que biofilmes são resistentes à força física e que organismos dentro do biofilme podem suportar uma série de adversidades como privações de nutriente, variações de pH, além de outras. Chibebe et al. (2002) acredita que a única forma de reduzir níveis de contaminação da água em equipamento odontológicos é eliminando ou prevenindo a formação de biofilme.

É importante ressaltar que os tratamentos utilizados em nosso trabalho são aplicados rotineiramente em consultórios odontológicos e foram testados para verificar a sua capacidade de remover biofilme. A esterilização é considerada o método mais seguro para eliminar micro-organismos e recomendado pelos órgãos competentes. A limpeza adequada dos instrumentos bem como a sua desinfecção são etapas que precedem a esterilização. A eficiência da esterilização vai depender, além de outros fatores, da eficiência daquelas etapas que a antecedem. Tanto a face externa quanto a face interna das canetas estão sujeitas a fácil contaminação quando são manipuladas pelo profissional de saúde. Na Tabela 8 estão descritos os micro-organismos isolados da superfície externa das canetas odontológicas que foram utilizadas previamente em procedimentos na cavidade bucal. A coleta foi realizada após a caneta estar em repouso durante 1, 2 e 24 h a partir do término de procedimentos dentários.

Além disso, também foi possível observar na face interna de alguns instrumentos, por fotomicrografias, estruturas sugestivas de micro-organismos e formações semelhantes a biofilme principalmente de caneta odontológica usada e desativada indefinidamente (Figura 11). É importante lembrar que alguns instrumentos odontológicos não são submetidos à esterilização em razão de não suportarem altas temperaturas produzidas pelos métodos físicos ou, no caso de métodos químicos, a deterioração do material provocada pela ação dos esterilizantes. Nessas situações, os instrumentos são submetidos apenas à desinfecção.

Outro aspecto importante a ser considerado é que os métodos para verificar a eficiência de agentes desinfetantes são baseados em testes de diluição de uso, que avaliam a ação dos biocidas principalmente contra células planctônicas e não contra células contidas no biofilme. Nesse sentido, foi importante em nosso trabalho a utilização de métodos para testar o efeito dos diferentes tratamentos na remoção de biofilme.

Ao analisar os procedimentos utilizados rotineiramente em consultórios odontológicos, este trabalho procurou dar uma contribuição para que se reavalie os processos de desinfecção dos equipamentos, no sentido de conferir maior proteção ao paciente e aos profissionais envolvidos. Porém, há necessidade de estudos posteriores para se testar esses e outros métodos utilizados para a remoção de micro-organismos em diferentes materiais de equipamentos médico-odontológicos.

## 7. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais desenvolvidas nesse estudo, houve formação de biofilme formado por *P. aeruginosa* e *S. aureus* em cupons de canetas odontológicas a partir do 6º dia de incubação.

Os métodos Vermelho Congo e Cristal Violeta mostraram-se indicadores de biofilme, podendo ser utilizados para demonstrar característica presuntiva para formação de biofilme.

A MEV e CBV mostraram-se métodos complementares ao avaliar biofilme bacteriano em cupons de canetas odontológicas.

Tratamentos com detergente enzimático e solução salina não removeram o biofilme induzido.

A lavagem ultra-sônica foi eficiente apenas na remoção de biofilme formado por *S. aureus*.

Tratamentos com ácido peracético, álcool 70% e glutaraldeído reduziram significativamente o número de células viáveis presentes no biofilme formado por ambas bactérias

Nas condições experimentais deste trabalho, utilizando-se concentrações recomendadas pelos fabricantes, esses biocidas podem ser utilizados para a desinfecção externa de canetas odontológicas.

Para a reutilização das canetas, no entanto, deve ser efetuada sua descontaminação, limpeza e posterior esterilização para garantir segurança à saúde dos pacientes e da equipe profissional.

Estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar o efeito desses tratamentos na superfície interna das canetas odontológicas.

## 8. PERSPECTIVAS

Testar outros agentes como hipoclorito e surfactantes avaliando, também, o efeito da associação de diferentes tratamentos para remoção de biofilme em superfície de canetas odontológicas.

Avaliar a produção e remoção de biofilme induzido por *P. aeruginosa* e *S. aureus* em diferentes superfícies.

Realizar experimentos semelhantes aos efetuados neste trabalho induzindo biofilme por adesão múltipla de bactérias.

Efetuar a caracterização genotípica e fenotípica de *P. aeruginosa* e *S. aureus* aderidos a diferentes superfícies, antes e após a sua remoção por diferentes tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAL. Associação Brasileira do Alumínio. Disponível em: <<http://www.abal.org.br/aluminio/historia.asp>>. Acesso em 29 jan. 2010.

ACPO. Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional. Protocolo: procedimentos compulsórios para uso do glutaraldeído, 1994. Disponível em: [http://www.acpo.org.br/campanhas/glutaraldeído/camp\\_glutaraldeído.htm](http://www.acpo.org.br/campanhas/glutaraldeído/camp_glutaraldeído.htm). Acesso em 12 dez. 2008.

ALFA, M. J.; JACKSON, M. A new hydrogen peroxide-based medical device detergent with germicidal properties: comparison with enzymatic cleaners. **American Journal of Infection Control**. v. 29, p. 168-177, 2001.

ANDERS, P. S. **Avaliação do processo de descontaminação de brocas odontológicas e seu impacto no controle de infecção**. 2006. 85f. Dissertação de Mestrado na área de concentração em microbiologia-Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ANDRADE, D. et al. Álcoois: a produção do conhecimento com ênfase na sua atividade antimicrobiana. **Medicina, Ribeirão Preto**. São Paulo, v. 35, p. 7-12, 2002.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizer against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**. v. 61, p. 833-838, 1998.

ANTUNES, A. L. S. et al. Detecção da Produção de Biofilme em *Staphylococcus sp.* por Ágar Congo Red. **Revista de Saúde da UCPEL**. Pelotas, v. 1, n. 1, Jan/Jun. 2007.

ARAÚJO, C. M.; LOPEZ-SILVA, A. M. S. Análise da qualidade da água de reservatórios de equipamentos odontológicos. **Revista de Biociências**. Taubaté, v. 8, n. 1, p. 29-36, 2002.

ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**. v. 9, n. 53, p. 40-45, 2000.

BAGG, J. et al. Pre-sterilisation cleaning of re-usable instruments in general dental practice. **British Dental Journal**. Glasgow, v. 202, n. 22, 2007.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 47, n. 2, p. 107 -112, 2001.

BOTT, T. R. Aspects of Biofilm Formation and Destruction. **Corrosion Reviews**. v. 11, p. 1-24, 1993.

BRANDA, S. S. et al. Biofilms: the matriz revisted. **Trends in Microbiology**. Boston, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de controle de infecção hospitalar. Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. 2. ed. Brasília, 1994. 50p. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/processamento\\_artigos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/processamento_artigos.pdf)

. Acesso em: 20 abr. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 156 p. – (**Série A. Normas e Manuais Técnicos**). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual\\_odonto.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_odonto.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2009.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75f. Dissertação de Mestrado em microbiologia agrícola, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAWRENCE, J. R. Imaging of Bacterial Cells by Fluorescence Exclusion Using Confocal Laser Microscopy. **Journal Microbiological Methods**. v.15,n. 249, 1992.

CASTRO, L. A. S. **Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 37p.

CHAVANT, P. et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bactéria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 68, p. 605-612, 2007.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 186f. Dissertação de Mestrado na área de tecnologia do ambiente-Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal. Jaboticabal.

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

COSTERTON, J. W.; et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review Microbiology**. v. 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1319-1322, 1999.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**. v. 49, p. 711-745, 1995.

DABIONLINE. A Importância da Esterilização das Peças de Mão. DabiOnline, informativo de divulgação da dabi atlante n. 1, 2003. Disponível em: <<http://www.dabiatlante.com.br/trabalhos/4.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DENYER, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Brighton, p. 227-245, 1995.

DINGES, M. M.; ORWIN, P.M.; SCHLIERVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 1, p. 6-34, 2000.

DISCACCIATI, J. A. C. et al. Verificação da dispersão de respingos durante o trabalho do cirurgião dentista. **Revista Panamericana de Salud Pública**. Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 84-87, 1998.

FERREIRA, E. L. et al. Avaliação do efeito dos processos de esterilização e desinfecção em brocas de aço carbide associados ou não ao uso de lubrificantes **Revista Abo Nacional**. v. 8, n. 6, p. 375-381, 2001.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. **Biofouling**. v. 11, p. 81-97, 1997.

FRANCO, F. F. S. et al. Review article. Biofilm formation and control in dental unit waterlines. In: **Biofilms**. Cambridge: Cambridge University Press. v. 2, p. 9-17, 2005.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

GALVÃO, C. F.; MOTTA, G. F.; ALVAREZ-LEITE, M. E. Análise quantitativa da água das tubulações de equipamentos odontológicos. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**. Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2006.

GAYLARDE, C. C. Desing, selection and use of biocides. *In: Bioextraction and Biodeterioration of metals*. The biology of world resources series. Cambridge:Cambridge University Press, 1995, cap. 10, p. 327-361.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**. United kingdom, v. 87, p. 41-48, 1999.

GONÇALVES, L. B.; RAMOS, A. L.; GASPARETO, A. Avaliação do efeito da clorexidina 0,12% na redução de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimento de profilaxia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia**. Maringa, v. 11, n. 3, p. 88-92, 2006.

GONÇALVES, N. J.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Ação de biocida à base de glutaraldeído e sal quaternário de amônio no controle de micro-organismos sésseis. *In: 6° CONFERÊNCIA SOBRE TECNOLOGIA DE EQUIPAMENTOS*, 2002. **Trabalhos técnicos**, Salvador.

GREEN, P.N. Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**. Aberdeen, v. 17, p.158-161, 1993.

HENTZER, M. et al. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. **Journal of Bacteriology**. v. 183, n. 18, p. 5395–5401, 2001.

HILBERT, L. R. et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 52, p. 175-185, 2003.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**. v. 76, p. 88–92, 2009.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**. v. 236, p.163-173, 2004.

JOHANSEN, C.; FALHOLT, P.; GRAM, L. Enzymatic Removal and Disinfection of Bacterial Biofilms. **Applied And Environmental Microbiology**.v. 63, n. 9, p. 3724–3728, 1997.

JUNIOR, W. B. C.; FRANÇA, F. P.; DUTA, F. P. Efeito do teor do cromo na aderência de micro-organismos em ligas de aço carbono. In: 6° CONFERÊNCIA SOBRE TECNOLOGIA DE EQUIPAMENTOS, 2002. **Trabalhos técnicos**, Salvador.

KIRISITS, M. J.; PARSEK, M. R. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? Microreview. **Cellular Microbiology**. v. 8, n. 12, p. 1841–1849, 2006.

KITIS, M. Desinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**. v. 30, p. 47-55, 2003.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: ASM Press, 1999, p. 264.

LEE, A. K.; NEWMAN, D. K. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 62, p. 134-139, 2003.

LEVINSON, W. E.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 632p.

LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance: **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 45, n. 4, p. 999–1007, 2001.

LOCATELLI, C. I. et al. Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. **Arquivo Brasileiro de oftalmologia**. v. 67, p. 241-248, 2004.

MACEDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da industria farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**. v. 2, n.7, p. 19-24, 2000.

MARQUES, S. C. et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some chemical sanitizers. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 38, p. 538-543, 2007.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the absorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**. v. 68, p. 337-348, 1971.

MARTINS, S. T.; FERREIRA, E. P.; FERREIRA, I. R. C. Processamento de superfícies, linhas de água, roupa e limpeza geral. In: Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 156 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <

[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual\\_odonto.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_odonto.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2009.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm Formation in the Industry: a Review. **Food Review International**. v. 8, p. 573-603, 1992.

MEDEIROS, U. V.; CARDOSO, A. S.; FERREIRA, S. M. S. Uso das normas de controle de infecção na prática odontológica. **Revista Brasileira de Odontologia**. v. 55, n. 1, p. 209-215, 1998.

MELO, L. F. Biofilmes e o Controle da Poluição. **Boletim de Biotecnologia**, v. 48, p. 16-25, 1994.

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* Isoladas dos casos de mastite subclínica Bovina**. 2008. 101f. Dissertação de Mestrado na área de medicina veterinária preventiva-Faculdade de Ciências Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Germany, v. 51, p. 249-253, 2003.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: tenyears of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**. Boston, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.

MORAES, R. Equipamentos odontológicos: no consultório do dentista. **Revista Alumínio**. Ano 4, n. 14, 2008. Disponível em: <http://www.revistaaluminio.com.br/textos.asp?codigo=11155>. Acesso em 20 set. 2009.

MOREIRA, A. C. A.; PEREIRA, A. F.; MENEZES, A. R. Contaminação da água de equipamentos odontológicos por *Pseudomonas sp.* **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v. 5, n. 2, p. 146-150, 2006.

MÜLLER, S. et al. Manometria esofágica: limpeza e desinfecção do equipamento com glutaraldeído. Protocolo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. **Arquivos de Gastroenterologia**. São Paulo, v. 38 n. 4, 2001.

NOTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of microoganisms in food processing plants: A review. **Biofouling**. v. 5, p. 1-16, 1991.

O'TOOLE, G.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**. v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998.

PARASHOS, P.; LINSUWANONT, P.; MESSER, H. H. A cleaning protocol for rotary nickel-titanium endodontic instruments. **Australian Dental Journal**.v. 49, n. 1, p. 20-27, 2004.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004.

PEDROSO, L. H. **Recomendações práticas de biossegurança e esterilização em odontologia**. Campinas: Komedi, 2004. 120p.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 72, p. 157-165, 2007.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**. v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

REISNER, A. et al. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 10, p. 3572-3581, 2006.

RISSE-BUHL, U.; KÜSEL, K. Colonization dynamics of biofilm-associated ciliate morphotypes at different flow velocities. **European Journal of Protistology**. v. 45, p. 64-76, 2008.

RIVAS, L.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. **Journal of Microbiological Methods**. Austrália, n. 69 p. 44–51, 2007.

RODE, T. M. et al. Different patterns of biofilm in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 116, p. 372-383, 2007.

ROHDE, H. et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**. 2009.

ROMANOVA, N. A. et al. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**. v. 71, p. 231–237, 2007.

RONNER, A. B., WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**. v.56, p. 750-758, 1993.

ROSADO, M. S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. 2009. 98f. Dissertação de Mestrado na área de tecnologia de alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RUSSO, E. M. A. et al. Avaliação da intensidade de contaminação de pontas de seringa tríplice. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. São Paulo, v. 14, n. 3, p. 243-247, 2000.

SÁ, M. H. B. Controle do crescimento microbiano por processos físicos e químicos. In: VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap 4, p. 185-263.

SCHMIDT, D. R. C.; YONEKURA, C. S. I.; GIL, R. F. Instrumento para avaliação de detergentes enzimáticos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 42, n. 2, p. 282-289, 2008.

SEO, Y. et al. The application of a mulch biofilm barrier for surfactant enhanced polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Environmental Pollution**. v. 157, p. 95–101, 2009.

SESMA, N. et al. Capacidade de remoção do biofilme por meio de um produto enzimático para higienização de bases protéticas. **Revista de Pós Graduação**. Tatuapé, v. 12, n. 4, p. 417-422, 2005.

SILVA, G. M. M. C. **Metais e ligas metálicas**: Uma abordagem experimental no secundário. 2007. 127f. Dissertação de Mestrado em Química para ensino-Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.

SILVA, P. B. E.; PATROCINIO, M. C.; NEVES, A. C. C. Avaliação da conduta de biossegurança em clínicas odontológicas de graduação. **Revista de Biociências**. Taubaté, v. 8, n. 1, p. 45-52, 2002.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, v. 43, p. 229-237, 2009.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido Peracético na inativação de *e. Coli*, colifagos e *C. Perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n. 2, p. 111-117, 2005.

SOUZA-GUGELMIN, M. C. M. et al. Microbial contamination in dental unit waterlines. **Brazilian Dental Journal**. São Paulo, v. 14, n. 1, p. 55-57, 2003.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 4, p. 744-750, 2007.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**. Oxford, v.52, n.4, p.917-924, 2004.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**. v. 40, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica** . v. 115, p. 891–899, 2007.

STORTI, A. et al. Biofilme detectado em ponta de cateter venoso central por cultura usando método quantitativo. **Revista Brasileira de A C**. v. 39, n. 3, p. 183-187, 2007.

SURMAN, S. B. et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. **Journal Microbiological Methods**. v. 25, p. 57-70, 1995.

SVIDZINSKI, A. E. et al. Eficiência do ácido peracético no controle de *staphylococcus*. **Ciência, Cuidado e Saúde**. Maringá, v. 6, n. 3, p. 312-318, 2007.

SZYMANSKA, J. Electron microscopic examination of dental unit waterlines biofilm. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. Lublin, v. 12, n. 1, p. 295-298, 2005.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surfae structure in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**. Belgium, n. 156, p. 626-636, 2005.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**. v. 43, n. 4, p. 474-477, 1995.

VERMELHO, A. B. Nutrição e crescimento das células procarióticas. *In*: VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap 3, p. 123-183.

VUONG, C. et al. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal Infection Disease**. v.182, p.1688-1693, 2000.

WALKER, J. T. et al. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. **Applied and Environmental Microbiology**. United Kingdon, v. 66, n. 8, p. 3363-3367, 2000.

WHITWORTH, C. L. et al. A comparison of descontamination methods used for dental burs. **British Dental Journal**. London, v. 197, n. 10, p. 635-640, 2004.

WILKS, S. A.; MICHELS, H. T.; WILLIAM KEEVIL, C. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination. **International Journal of Food Microbiology**. v. 111, p. 93-98, 2006.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial avaluation of the biotranfer potencial from surfaces whih bacillus biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**. v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

WOOD, P. et al. A Novel Strategy for Control of Microbial Biofilms through Generation of Biocide at the Biofilm-Surface Interface. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 62, n. 7, p. 2598-2602, 1996.

## 10. ANEXOS

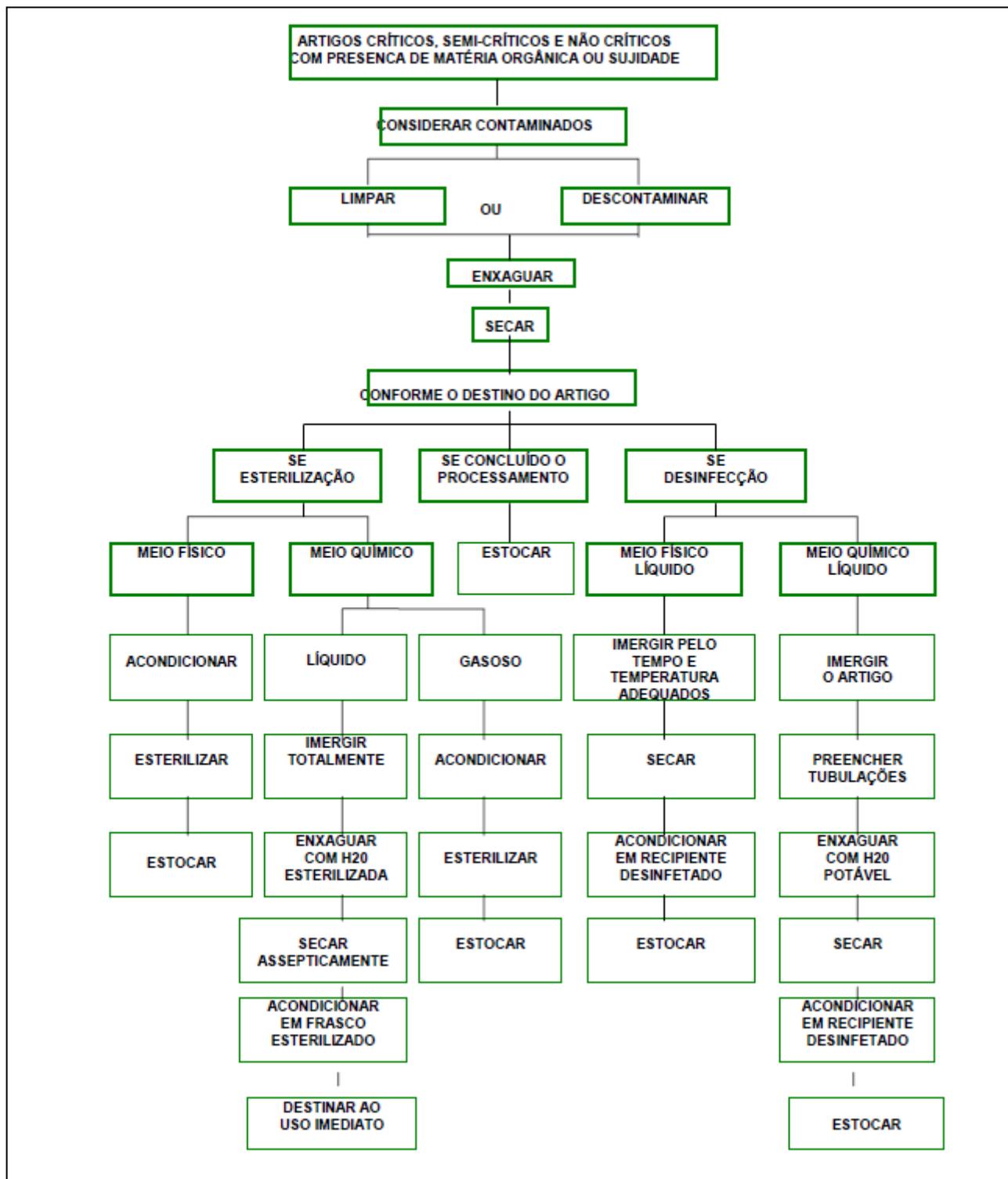
### 10.1 Principais desinfetantes químicos utilizados em artigos odontológicos.

Produto	Concentração	Modo de Aplicação	Nível	Espectro
Álcool	Ótima ação germicida a 70%.	Fricção, em três etapas intercaladas pelo tempo de secagem natural, totalizando 10 minutos.	Médio	Tuberculicida, bactericida, fungicida e viruscida; não é esporicida.
Glutaraldeído	2%	Imersão, durante 30 minutos.	Alto nível	Bactericida, fungicida, viruscida, micobactericida e esporicida.
Hipoclorito de sódio	1%	Imersão, durante 30 minutos. Superfícies com matéria orgânica, aplicar por 2 a 5 minutos e proceder à limpeza.	Médio	Bactericida, fungicida, viruscida e esporicida.
Ácido Peracético	0,001 a 0,2%	Imersão, durante 10 minutos.	Alto	Bactericida, fungicida, viruscida e esporicida.

## 10.2 Classificação de acordo com o tipo de aplicação e espectro de ação

<b>Tratamentos</b>	<b>Tipo de aplicação</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Glutaraldeído	Desinfecção e Esterilização	Forma ligações cruzadas em proteínas
Ácido peracético	Desinfecção e Esterilização	Oxidação de proteínas
Álcool	Desinfecção	Desnaturação e desidratação
Detergente enzimático	Limpeza	Emulsão de macromoléculas livres
Solução salina	Risagem celular, diluição	Manutenção osmolaridade
Lavagem ultra-sônica	Limpeza	Ação mecânica por cavitação

### 10.3 Fluxograma dos passos seqüenciais do processamento de artigos em estabelecimentos de saúde



## 10.4. Composição dos meios de cultura

### 10.4.1

#### BHI HIMEDIA

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração (g.L)-1</b>
Infusão de Cérebro de Bezerro	200
Infusão de Bife e Coração	250
Peptona Proteose	10
Dextrose	2
Cloreto de Sódio	5
Fosfato Dissódico	2,5

### 10.4.2

#### TSB

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração (g.L)-1</b>
Caseína Enzimática Hidrolisada	17
Digestão Papaica de Farinha de Soja	3
Cloreto de Sódio	5
Fosfato Dipotássico de Hidrogênio	2,5
Dextrose	2,5

**10.4.3****TSA HIMEDIA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração (g.L)-1</b>
Caseína enzimática hidrolisada	15
Digestão papaica de farinha de soja	5
Cloreto de sódio	5
Ágar	15

**10.4.4****CRA**

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentração (g.L)-1</b>
BHI	37
Ágar base	15
Sacarose (sigma)	50
Corante vermelho Congo (sigma)	0,8

### **10.5 Protocolo para preparação dos meios**

1. Pesar a quantidade de meio de cultura e/ou complementos necessários para preparar o volume adequado ao seu experimento. A quantidade especificada pelo fabricante esta no Anexo 10.4.
2. Medir o volume necessário de água destilada numa proveta e transferir para um frasco o meio em pó que pesou e a água destilada.
3. Dissolver o meio na água destilada e agitar com um magnete (barra magnética) dentro do frasco ou um bastão de vidro. Completar o volume do meio com água logo que se formar uma solução homogênea.
4. Verificar e ajustar o pH, caso necessário, adicionando solução ácida ou alcalina até atingir um pH indicado para o meio.
5. Acondicionar o meio em frasco, tampar, proteger com papel e barbante.
6. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15- 20 minutos.
7. Retirar o frasco da autoclave e deixar arrefecer até atingir uma temperatura de 50 -70°C.

8. Guardar o meio-caldo na geladeira para posterior utilização ou distribuir o meio em placas de Petri em condições de assepsia e armazenar na geladeira em sacos plásticos.
9. Deixar solidificar, identificar, datar, inverter e guardar a 4°C.

### 10.6 Fórmula utilizada para o cálculo do inóculo inicial

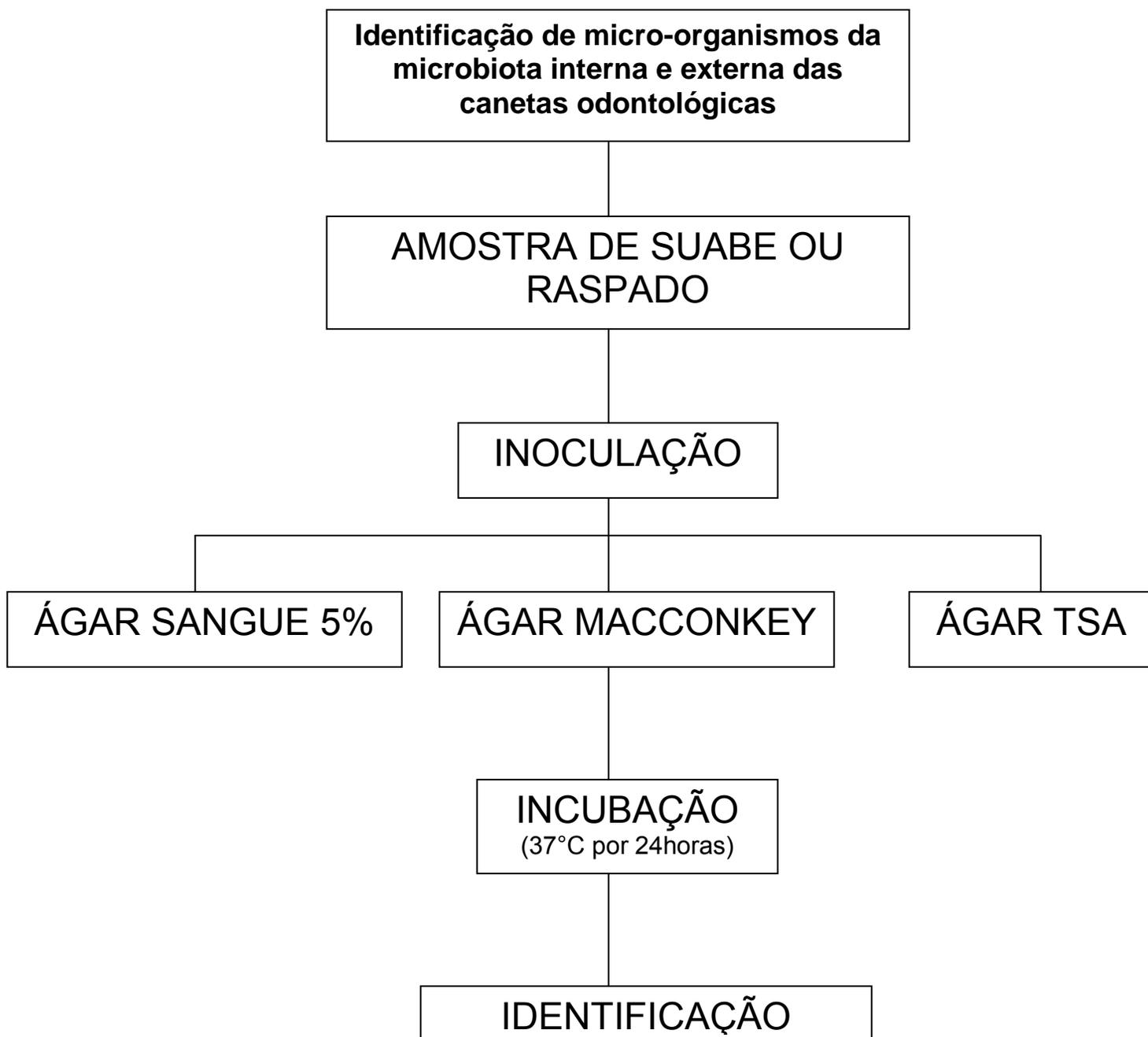
$$\text{Volume i} \times \text{Absorbância i} = \text{Volume ii} \times \text{Absorbância ii.}$$

### 10.7 O cálculo das unidades formadoras de colônia obedeceu à equação descrita por Chaves, (2004).

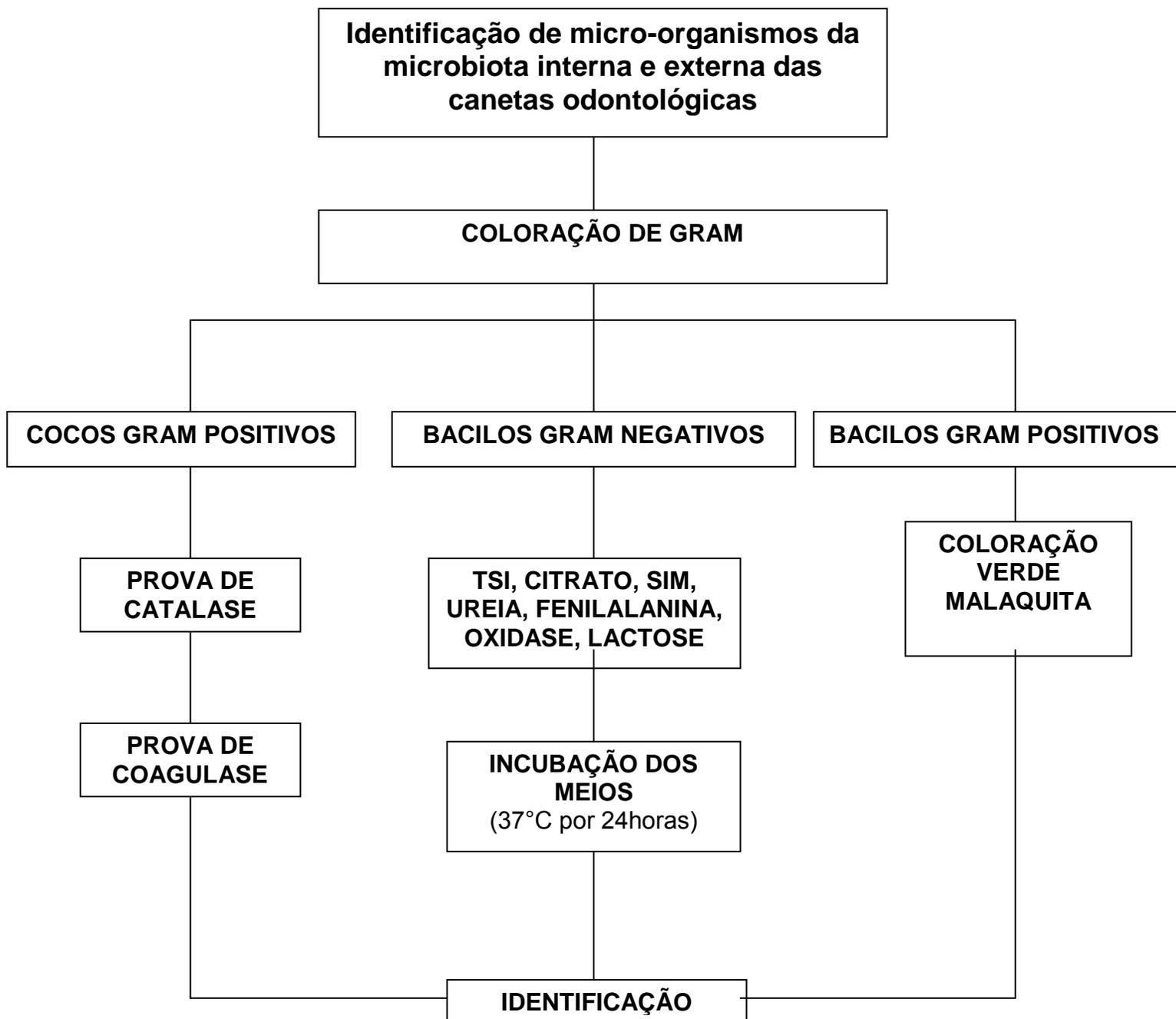
$$\text{UFC/cm}^2 = \text{Média} \times \frac{\text{Volume de suspensão do biofilme}}{\text{Área de superfície de adesão}} \times \text{fator de diluição}$$

Média = média do número de colônias contadas nas placas

## 10.8 Inoculação



### 10.9 Identificação



### 10.10 Valores da curva de crescimento

T(h)	1	2	3	4	media	dp	CEPAS
0	390000	300000	320000	280000	322500	47871,35539	<i>Pseudomonas</i>
1,5	3900000	4000000	3600000	2600000	3525000	639661,3687	<i>Pseudomonas</i>
3	3800000	4100000	9000000	9500000	6600000	3069201,851	<i>Pseudomonas</i>
4,5	8500000	16100000	27500000	27000000	19775000	9174375,546	<i>Pseudomonas</i>
6	28000000	28000000	30000000	50000000	34000000	10708252,27	<i>Pseudomonas</i>
7,5	30000000	35000000	109000000	100000000	68500000	41781175,98	<i>Pseudomonas</i>
9	480000000	550000000	320000000	350000000	425000000	108474267,3	<i>Pseudomonas</i>
24	9,4E+09	1E+10	3000000000	3600000000	6500000000	3711244176	<i>Pseudomonas</i>
26	8E+09	1,18E+10	1,05E+10	10400000000	10175000000	1584034932	<i>Pseudomonas</i>
0	112000	98000	100000	99000	102250	6551,081336	<i>Staphylococcus</i>
1,5	300000	300000	250000	280000	282500	23629,07813	<i>Staphylococcus</i>
3	700000	650000	670000	680000	675000	20816,65999	<i>Staphylococcus</i>
4,5	4000000	4500000	4200000	3800000	4125000	298607,8811	<i>Staphylococcus</i>
6	51000000	58000000	45000000	48000000	50500000	5567764,363	<i>Staphylococcus</i>
7,5	105000000	115000000	112000000	100000000	108000000	6782329,983	<i>Staphylococcus</i>
9	155000000	150000000	165000000	160000000	157500000	6454972,244	<i>Staphylococcus</i>
24	300000000	350000000	250000000	300000000	300000000	40824829,05	<i>Staphylococcus</i>
26	1,23E+09	1200000000	1150000000	1120000000	1175000000	49328828,62	<i>Staphylococcus</i>

#### 10.10.1 Valores da curva de adesão a cupons de canetas odontológicas

CURVA	TEMPO (dias)						CEPAS
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	
	0	2	4	6	10	14	
1	0	490000	790000	1700000	7300000	8500000	<i>Pseudomonas</i>
2	0	430000	750000	8900000	5100000	9600000	<i>Pseudomonas</i>
1	0	1800000	2500000	1000000	480000000	660000000	<i>Staphylococcus</i>
2	0	42000000	2700000	4200000	360000000	630000000	<i>Staphylococcus</i>

### 10.10.2 Valores dos diferentes tratamentos sobre o biofilme expresso em unidades formadoras de colônia

ANTES	CONTAGEM DEPOIS	TRATAMENTO	CEPAS	p
6E+07	26000000	1	<i>Pseudomonas</i>	0,182
6E+07	26000000	1	<i>Pseudomonas</i>	0,182
9E+06	8900000	1	<i>Pseudomonas</i>	0,182
9E+06	8600000	1	<i>Pseudomonas</i>	0,182
6E+07	0	2	<i>Pseudomonas</i>	0,008
6E+07	0	2	<i>Pseudomonas</i>	0,008
9E+06	0	2	<i>Pseudomonas</i>	0,008
9E+06	0	2	<i>Pseudomonas</i>	0,008
6E+07	0	3	<i>Pseudomonas</i>	0,008
6E+07	0	3	<i>Pseudomonas</i>	0,008
9E+06	0	3	<i>Pseudomonas</i>	0,008
9E+06	0	3	<i>Pseudomonas</i>	0,008
6E+07	0	4	<i>Pseudomonas</i>	0,008
6E+07	0	4	<i>Pseudomonas</i>	0,008
9E+06	0	4	<i>Pseudomonas</i>	0,008
9E+06	0	4	<i>Pseudomonas</i>	0,008
6E+07	2800000	5	<i>Pseudomonas</i>	0,11
6E+07	3400000	5	<i>Pseudomonas</i>	0,11
9E+06	2100000	5	<i>Pseudomonas</i>	0,11
9E+06	2000000	5	<i>Pseudomonas</i>	0,11
6E+07	41000000	6	<i>Pseudomonas</i>	0,639
6E+07	99000000	6	<i>Pseudomonas</i>	0,639
9E+06	7400000	6	<i>Pseudomonas</i>	0,639
9E+06	6700000	6	<i>Pseudomonas</i>	0,639

1-Detergente enzimático  
 2-Ácido peracético  
 3- Glutaraldeído  
 4-Álcool 70%  
 5-Lavagem ultra-sonica  
 6-Solução salina

### 10.10.3 Valores dos diferentes tratamentos sobre o biofilme expresso em unidades formadoras de colônia

ANTES	CONTAGEM DEPOIS	TRATAMENTO	CEPAS	p
2E+07	7400000	1	<i>Staphylococcus</i>	0,25
2E+07	10000000	1	<i>Staphylococcus</i>	0,25
3E+06	250000	1	<i>Staphylococcus</i>	0,25
3E+06	290000	1	<i>Staphylococcus</i>	0,25
2E+07	0	2	<i>Staphylococcus</i>	0,006
2E+07	0	2	<i>Staphylococcus</i>	0,006
3E+06	0	2	<i>Staphylococcus</i>	0,006
3E+06	0	2	<i>Staphylococcus</i>	0,006
2E+07	0	3	<i>Staphylococcus</i>	0,006
2E+07	0	3	<i>Staphylococcus</i>	0,006
3E+06	0	3	<i>Staphylococcus</i>	0,006
3E+06	0	3	<i>Staphylococcus</i>	0,006
2E+07	0	4	<i>Staphylococcus</i>	0,006
2E+07	0	4	<i>Staphylococcus</i>	0,006
3E+06	0	4	<i>Staphylococcus</i>	0,006
3E+06	0	4	<i>Staphylococcus</i>	0,006
2E+07	86000	5	<i>Staphylococcus</i>	0,001
2E+07	80000	5	<i>Staphylococcus</i>	0,001
3E+06	86000	5	<i>Staphylococcus</i>	0,001
3E+06	80000	5	<i>Staphylococcus</i>	0,001
2E+07	4600000	6	<i>Staphylococcus</i>	0,16
2E+07	5300000	6	<i>Staphylococcus</i>	0,16
3E+06	3400000	6	<i>Staphylococcus</i>	0,16
3E+06	2600000	6	<i>Staphylococcus</i>	0,16