

## EFEITO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DA ÁGUA OZONIZADA EM PONTAS DIAMANTADAS ODONTOLÓGICAS

Júlio Cesar<sup>1</sup>, Tânia Cristina Sumita<sup>2</sup>, Priscila Christiane Suzy Liporoni<sup>3</sup>, Antonio Olavo Cardoso Jorge<sup>4</sup>, Marcos Augusto do Rego<sup>5</sup>

<sup>1</sup>UNITAU, Mestre em Odontologia, Subárea Dentística

<sup>2</sup>UNITAU, Laboratório de Microbiologia

<sup>3</sup>UNIVAP e UNITAU, Curso de Odontologia

<sup>4</sup>UNITAU e UNESP, Curso de Odontologia

<sup>5</sup>UNIVAP e UNITAU, Curso de Odontologia. Rua José Pereira dos Santos, 233 – URBANOVA – São José dos Campos, SP. CEP 12 244 484 marcosreg@uol.com.br

**Resumo-** A necessidade do controle de infecção vem direcionando a odontologia contemporânea na busca de métodos de esterilização eficazes e rápidos. O ozônio tem sido utilizado como uma alternativa no processo de descontaminação da água, alimentos, equipamentos e instrumentos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos da água ozonizada em pontas diamantadas odontológicas. Foram utilizadas 120 pontas diamantadas previamente esterilizadas, que foram contaminadas com *Escherichia coli* esporos de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A seguir, as pontas foram submetidas à água ozonizada (10 mg/l), durante 10 e 30 minutos, e os efeitos da desinfecção foram avaliadas por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos respectivos microrganismos, em meios de cultura adequados. A água ozonizada na concentração de 10 mg/L, nos tempos de imersão de 10 e 30 minutos, foi eficaz, de forma significativa, na redução do número de UFC/mL de *E. coli*, *S. aureus*; *C. albicans* e esporos de *B. subtilis*, promovendo redução de 90,15 em 10 min e de 99,93% em 30 min para os microrganismos testados, podendo portanto, ser utilizada como agente antimicrobiano na desinfecção de pontas diamantadas.

**Palavras-chave:** esterilização, desinfecção, ozônio, pontas diamantadas

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde

### Introdução

O controle de infecção é uma das etapas mais importantes para se alcançar excelência no atendimento odontológico. O aumento na incidência de doenças infecto-contagiosas, de variadas etiologias, obrigou os profissionais da odontologia, a adotar mecanismos de controle de microrganismos e de proteção, para a sua equipe e para seus pacientes. Todo paciente que busca o tratamento bucal deve ser considerado como potencialmente portador de alguma doença infecto-contagiosa (SOUZA, 1997). Assim, medidas de rotina para controle de microrganismos devem ser seguidas rigorosamente na clínica diária (ESTRELA; ESTRELA, 2003).

Tendo em vista o tipo e utilização do instrumental ou material odontológico, os artigos devem ser submetidos à esterilização ou desinfecção. Os métodos de esterilização que envolvem procedimentos físicos (autoclave e estufa) são os mais frequentemente utilizados nas clínicas odontológicas. São recomendados para a maior parte do instrumental clínico, exceto para aqueles sensíveis ao calor. Os procedimentos de desinfecção são indicados na impossibilidade de

submeter o artigo ao processo de esterilização (REGO; JORGE, 2006).

Inúmeros desinfetantes são utilizados em odontologia, sendo que para cada princípio ativo de desinfetante, existem dezenas de produtos comerciais disponíveis. Apesar disso, não existe ainda um produto ideal para utilização no consultório odontológico e cada produto apresenta suas indicações e restrições. Formas alternativas para esterilização/desinfecção de instrumentos e materiais odontológicos têm sido constantemente pesquisadas, dentre as quais o ozônio apresenta importância.

O ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio, sendo um poderoso agente oxidante. Acredita-se que ele possa oxidar aminoácidos e destruir proteínas presentes na membrana citoplasmática dos microrganismos e com isso, apresentar excelentes propriedades antimicrobianas. Pode, também, inibir crescimento de fungos e interromper o ciclo de replicação viral alterando o contato do vírus com a célula por meio da peroxidação (GURLEY, 1985).

A utilização do ozônio, na forma de óleo ou água ozonizados, tem sido relatada na odontologia

por alguns autores (MURAKAMI et al., 2002; NAGAYOSHI et al., 2004), entretanto, o potencial da água ozonizada para esterilização ou desinfecção de materiais e instrumental tem sido pouco relatado na literatura. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano da água ozonizada, em pontas diamantadas odontológicas, contaminadas por *Escherichia coli*, esporos de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

## Material e Método

Foram utilizadas 120 pontas diamantadas (1016, KG Sorensen) novas, previamente esterilizadas em autoclave (121°C/15 min), as quais foram contaminadas com suspensão de *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, esporos de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538 e *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 18804. As cepas, após reativação, foram semeadas em agar infusão de cérebro coração (BHI, Difco) para *E. coli* e *S. aureus*. Para *C. albicans* utilizou-se ágar Sabouraud Dextrose (Difco) e para obtenção de esporos de *B. subtilis* utilizou-se a técnica preconizada por Stella (1995). Após crescimento dos microrganismos, foram obtidas suspensões em solução fisiológica (0,9%) esterilizada, padronizadas de acordo com tubo 1 da escala de McFarland.

As pontas diamantadas foram dispostas em placas de Petri esterilizadas, contendo 20 ml de suspensão de cada microrganismo, por um período de 30 min para haver a contaminação. A seguir, cada ponta foi colocada, em tubo plástico contendo 1 ml de água destilada ozonizada (10 mg/l) e permaneceram durante 10 e 30 minutos respectivamente. Após os períodos de tempo, o ozônio foi neutralizado com 0,1 ml de tiosulfato de sódio (0,1 M). Os tubos foram, então, agitados individualmente, durante 30 s (Vortex) e foram obtidas diluições de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . A seguir, foi retirado 0,1 ml de solução de cada tubo Eppendorf e de cada diluição, as quais foram semeadas em duplicata em agar BHI para *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*. Para *C. albicans* foi utilizado agar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas (37°C/48 h), as unidades formadoras de colônias (UFC/ml) foram quantificadas e os dados obtidos convertidos para log UFC/ml. Para o grupo controle, as pontas diamantadas permaneceram em água destilada esterilizada durante 30 min.

A água ozonizada foi obtida por meio do ozonizador desenvolvido pelo Instituto Tecnológico da Aeronáutica (ITA, São José dos Campos), conectado a um cilindro de oxigênio puro (White

Martins) aferido na vazão constante de 0,4 mg/l de oxigênio por minuto. O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia da UNITAU.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA, teste de Tukey, considerando-se diferença estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

Pode-se observar na Tabela 1, que a água ozonizada diminuiu acentuadamente, com diferença estatística, a quantidade de log UFC/ml para todos os microrganismos testados. A maior contaminação ocorreu por *B. subtilis*, seguido por *S. aureus*, *C. albicans* e *E. coli*.

Os percentuais de redução de microrganismos obtidos pela água ozonizada estão expressos na Tabela 2. Observa-se nesta tabela, que a redução foi de 90,15% para esporos de *B. subtilis* submetido à água ozonizada por 10 min, enquanto o percentual máximo de redução ocorreu para *E. coli* (99,93%) no período de 30 min.

Tabela 1 – Médias e desvio-padrão do log UFC/ml dos microrganismos testados, obtidas no grupo controle e após desinfecção com água ozonizada durante 10 e 30 min

Microrganismo	Controle (UFC/ml)	Água ozonizada (UFC/ml)	
		10 min	30 min
<i>E. coli</i>	4,51 ± 0,20 <sup>A</sup>	1,80 ± 0,80 <sup>B</sup>	0,74 ± 0,87 <sup>C</sup>
<i>S. aureus</i>	4,86 ± 0,47 <sup>A</sup>	2,71 ± 0,38 <sup>B</sup>	1,66 ± 0,71 <sup>C</sup>
<i>C. albicans</i>	4,67 ± 0,19 <sup>A</sup>	3,22 ± 0,27 <sup>B</sup>	2,52 ± 0,46 <sup>C</sup>
<i>B. subtilis</i>	5,31 ± 0,19 <sup>A</sup>	4,30 ± 0,20 <sup>B</sup>	3,34 ± 0,31 <sup>C</sup>

Letras distintas (A, B, C): diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )

Tabela 2 – Percentual (%) de redução de microrganismos encontrados em pontas diamantadas (n=10) após contaminação e tratamento com água ozonizada durante 10 e 30 min

Microrganismo	Ozônio	
	10 min %	30 min %
<i>E. coli</i>	99,63	99,93
<i>S. aureus</i>	99,28	99,91
<i>B. subtilis</i>	90,15	98,74
<i>C. albicans</i>	96,21	99,02

## Discussão

A utilização da água ozonizada como agente desinfetante de instrumentos odontológicos, pareceu-nos de importância para a odontologia, o que levou à realização do presente trabalho. Optou-se pela utilização de pontas diamantadas, pois são utilizadas rotineiramente no consultório odontológico para preparos cavitários. Além disso,

apresentam tamanho pequeno e a presença de rugosidades que poderiam reter microrganismos. Os procedimentos de esterilização por meio do calor danificam de certa forma, esses instrumentais, assim como diminuem seu poder de desgaste (GUTTORMSEN; MYKLEBUST, 1986).

Os microrganismos empregados neste estudo constituem-se daqueles de importância médico-odontológica que apresentavam características diferentes do ponto de vista de resistência aos procedimentos de controle.

*E. coli* foi utilizado por tratar-se de microrganismo comumente encontrado no intestino humano e apresentar potencial de patogenicidade. O homem elimina mais de  $10^8$  células de *E. coli* por grama de fezes (UENO; JORGE, 2006). É um microrganismo utilizado como parâmetro para estudos de controle microbiano, além de diversas outras pesquisas. Nos dados do presente estudo, a maior redução microbiana ocorreu para *E. coli* (99,9% no período de 30 minutos).

*S. aureus* constitui-se importante patógeno de doenças humanas, correlacionados com infecções piogênicas e intoxicação alimentar. É um microrganismo muito resistente aos antibióticos, sendo por este motivo, uma das principais bactérias envolvidas em infecção hospitalar. Estudos de controle de *S. aureus* sempre apresentam, por este motivo, importância em microbiologia médica (UENO; JORGE, 2006). Observou-se redução significativa de *S. aureus* nas pontas diamantadas após imersão em água ozonizada por 10 e 30 min em relação ao controle.

Optou-se pela utilização de *C. albicans*, pois esse microrganismo é uma levedura comumente encontrada na cavidade bucal humana. A espécie *C. albicans* é a mais freqüente e a que apresenta maior número de fatores de virulência (KOGA-ITO; MARTINS; JORGE, 2006).

*B. subtilis* é muito resistente aos procedimentos de controle de microrganismos por apresentar esporos, importante forma de resistência bacteriana. É utilizado como parâmetro para testes de procedimentos físicos e químicos de controle de microrganismos (JUNQUEIRA; JORGE, 2006), o que levou à escolha dessa bactéria neste trabalho. Observou-se nos dados do presente estudo, que maior contaminação microbiana ocorreu nas pontas diamantadas expostas aos esporos de *B. subtilis* em relação aos demais microrganismos. Apesar de sua conhecida resistência, a água ozonizada apresentou efeitos sobre esporos no presente estudo. Ocorreu diminuição significativa na quantidade de esporos, após a imersão das pontas diamantadas contaminadas, tanto para o tempo de 10 como para 30 min.

O tempo de exposição e a concentração do ozônio seguiu modelos propostos anteriormente (MURAKAMI et al., 2002; JYOTI; PANDIT, 2004). A concentração utilizada de 10 mg/L deu-se em função do ozonizador do Laboratório de Microbiologia da UNITAU sendo equivalente a 41,6% da capacidade máxima de sua produção de ozônio.

Os resultados dos experimentos *in vitro* realizados em nosso estudo demonstraram que a água ozonizada na concentração de 10 mg/L nos tempos de 10 e 30 min foi eficaz para reduzir significativamente a quantidade de microrganismos presentes na superfície de pontas diamantadas odontológicas.

A água ozonizada promoveu redução entre 90,15 a 99,93% para todos os microrganismos testados. Como não ocorreu redução de 100% dos microrganismos, a água ozonizada nos tempos e concentração utilizados no presente estudo não demonstrou ser agente esterilizante. Ocorreu, entretanto, taxas elevadas de redução microbiana podendo ser indicado como agente desinfetante.

Por outro lado, de acordo com os resultados obtidos, embora em condições experimentais *in vitro*, necessita-se de cuidados ao considerar condições clínicas tornando-se necessários mais estudos para definir outras variáveis que devem ser investigadas. Quando da utilização das pontas diamantadas na cavidade bucal deve-se considerar alguns fatores que parecem-nos de importância: a) a quantidade de microrganismos nas pontas vai depender do tecido que está sendo desgastado, assim, tecido cariado deve, teoricamente, conter maior número de microrganismos que tecidos sem cárie; b) a ponta ao desgastar tecidos possivelmente possibilite maior retenção dos microrganismos em suas retenções e granulações, os quais podem ficar protegidos por resíduos de tecido desgastado; c) a microbiota bucal é muito rica em tipos bacterianos com diferentes características, sendo difícil avaliar qual tipo de microrganismo poderia estar presente nas pontas diamantadas após sua utilização; e, d) na microbiota bucal estão ocorrendo diversas interações entre os microrganismos, os mesmos estão em forma de biofilme na superfície dos dentes, o que pode conferir características adicionais de resistência.

Este trabalho abre novas perspectivas de pesquisas tais como: a) utilização da água ozonizada como meio de desinfecção de superfícies e de instrumentais; b) utilização da água ozonizada para lavagem de equipamentos de proteção; c) utilização de água ozonizada para procedimentos de desinfecção terminal

(descontaminação) de materiais e instrumentais; d) uso da água ozonizada para tratamento de resíduos odontológicos.

### Conclusões

Frente a metodologia apresentada e os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a água ozonizada (concentração 10 mg/l) nos tempos de imersão 10 e 30 min foi eficaz, de forma significativa, na redução do número de UFC/ml de *E. coli*, esporos de *B. subtilis*, *S. aureus* e *C. albicans* da superfície de pontas diamantadas odontológicas. Assim, a água ozonizada pode ser utilizada como agente antimicrobiano na desinfecção de pontas odontológicas.

### Referências

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A. **Controle de infecção em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas. 2002. 186p.

GURLEY, B. Ozone: pharmaceutical sterilant of the future?. **J. Parenteral Sci. Technol.** v.39, p.256-61, 1985.

GUTTORMSEN, V.; MYKLEBUST, A.S. Disinfection and esterilization of dental steel and diamond burs. An evaluation of diamond cleaner and corrosion damage caused by autoclaving. **Nor Tannlaegeforen Tid.** v.96, n.14, p.609-12. 1986.

JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Bacilos Gram-positivos. In: JORGE, A.O.C. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Santos. 2006. p.95-113.

JYOTI, K.K.; PANDIT, A.B. Ozone cavitation for water disinfection. **Biochem. Eng. J.** v.18, p.9-19. 2004.

KOGA-ITO, C.Y.; MARTINS, C.A.P., JORGE, A.O.C. In: JORGE, A.O.C. Estudo do gênero *Candida*. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Santos. 2006. p.219-35.

MURAKAMI, H.; MIZUGUCHI, M.; HATTORI, M.; ITO, Y.; KAWAI, T.; HASEGAWA, J. Effect of denture cleaner using ozone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *E. coli* T1 phage. **Dent. Mater. J.** v.21, n.1, p.53-60, 2002.

NAGAYOSHI, M.; FUKUIZUMI, T.; KITAMURA, C.; YANO, J.; TERASHITA, M.; NISHIHARA, T. Efficacy of ozone on survival and permeability of

oral microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.** v.19, n.4, p.240-6, 2004.

REGO, M. A.; JORGE, A.O.C. Biossegurança em odontologia. In: **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Santos. 2006. p.271-284.

SOUZA, H.M.M.R. Aids e o profissional de Odontologia. **Rev. ABO Nac.** v.5, n.4, p.256-9. 1997.

STELLA, S. R. B. R. Produção e controle de qualidade de indicadores biológicos para esterilização a vapor. **Rev. Bras. Anal. Clin.** v.27, n.1, p.31-6. 1995.

UENO, M.; JORGE, A.O.C. Bacilos Gram-negativos. In: JORGE, A.O.C. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Santos. 2006. p.115-41.