

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

TATIANA REGINA DE OLIVEIRA HEINZELMANN

**TÉCNICA EM AÇÃO COMBINADA UTILIZANDO ÁGUA OZONIZADA CORRENTE
E ULTRASSOM PARA A DESINFECÇÃO DE INSTRUMENTAL CIRÚRGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, junho/2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

TATIANA REGINA DE OLIVEIRA HEINZELMANN

**TÉCNICA EM AÇÃO COMBINADA UTILIZANDO ÁGUA OZONIZADA CORRENTE
E ULTRASSOM PARA A DESINFECÇÃO DE INSTRUMENTAL CIRÚRGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti

São José dos Campos, junho/2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

TATIANA REGINA DE OLIVEIRA HEINZELMANN

**TÉCNICA EM AÇÃO COMBINADA UTILIZANDO ÁGUA OZONIZADA CORRENTE
E ULTRASSOM PARA A DESINFECÇÃO DE INSTRUMENTAL CIRÚRGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Engenharia
Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti

Orientadora

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Álvaro José Damião (externo)

Instituto Tecnológico de Aeronáutica

Prof. Dr. Carlos José de Lima (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves (Suplente interno)

Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, junho/2023

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

TATIANA REGINA DE OLIVEIRA HEINZELMANN

Graduada em Farmácia Industrial pela Universidade de Mogi das Cruzes, pós-graduada em Farmácia Hospitalar pela Universidade de Mogi das Cruzes.

Ficha Catalográfica

H385t Heinzelmann, Tatiana Regina de Oliveira
Técnica em ação combinada utilizando água ozonizada corrente e ultrassom para a desinfecção de instrumental cirúrgico / Tatiana Regina de Oliveira Heinzelmann – 2023.
56f. ; 30 cm.

Orientador: Adriana Barrinha Fernandes Moretti.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2023.
Bibliografia: f. 52-56.

1. Engenharia Biomédica. 2. Desinfecção. 3. Água Ozonizada.
4. Ultrassom. 5. Staphylococcus Aureus. 6. Instrumental cirúrgico,
I. Título.

CDD 610.28

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha querida família

AGRADECIMENTOS

À Deus e meus queridos mentores por toda proteção e inspiração.

À minha orientadora, Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti por me acolher desde o início com tanto carinho e principalmente acreditar no meu potencial. Agradeço também pelos ensinamentos, preocupação com meu bem-estar, apoio nos momentos de dificuldade e inspiração.

Ao meu co-orientador, Dr. Carlos José de Lima pelo carinho, cuidado, apoio, parceria e todo ensinamento, sempre me incentivando a aprender coisas novas.

À minha família por todo amor, sempre me incentivando e me apoiando em todos os momentos, especialmente ao meu pai Luiz Sergio Heinzemann por todos os conselhos e ensinamentos e ao meu companheiro Gilberto Gomes da Cunha, por todo amor e cuidado.

Aos amigos Maycon Crispim de Oliveira Carvalho e Leandro de Lima Azevedo por toda paciência, apoio, parceria e amizade, que foram fundamentais nesse processo.

Aos amigos Letícia Santos, Pedro Marrafa, Bianca Kawata e Fernando Balbina por todo apoio e companhia em meus dias de trabalho.

À Nídia Lucia Domingues Macedo e todos os professores do programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica.

À Universidade Anhembi Morumbi e CAPES pelas bolsas de mestrado.

RESUMO

Infecções do sítio cirúrgico são as infecções mais comuns adquiridas em hospitais, sendo o *Staphylococcus aureus* o principal agente causador devido a sua capacidade de adesão à instrumentos médicos e formação de biofilmes. O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema hidrodinâmico inovador que utiliza água ozonizada e ultrassom para desinfecção de instrumentos cirúrgicos. Cabos de bisturi contaminados experimentalmente por *S. aureus* foram submetidos à processos de desinfecção no sistema hidrodinâmico utilizando água ozonizada (2,14 mg/cm² (O₃) por 5 minutos), ultrassom (40 KHz, 50 W acústico por 5 minutos) e a duas técnicas associadas (3mg/cm² (O₃) por 7 minutos). Foram realizados testes microbiológicos nos cabos de bisturi e água do sistema e imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) para avaliação da superfície do material após os procedimentos. Os resultados das análises microbiológicas demonstraram que a água ozonizada produziu uma desinfecção eficiente dos cabos de bisturi, com uma dosagem de ozônio aplicada de 2,14 mg/cm² em 5 minutos, porém as imagens demonstraram que *S. aureus*, mesmo inativadas, permaneceram na superfície dos instrumentos. O ultrassom não foi capaz de produzir um efeito microbicida em 5 minutos, mas demonstrou habilidade em remover os microrganismos da superfície dos instrumentos. Água ozonizada associada ao ultrassom, também indicou uma desinfecção eficiente dos cabos de bisturi com uma dosagem de ozônio aplicada de 3 mg/cm² em 7 minutos. Além disso, as imagens da superfície do material demonstraram que este tempo de desinfecção foi suficiente para remover praticamente toda bactéria aderida na superfície dos instrumentos. Esses resultados demonstram que o sistema hidrodinâmico é promissor para desinfetar instrumentos cirúrgicos, apresentando um potencial de esterilização, sendo necessários estudos futuros para se verificar este efeito.

Palavras-chave: Engenharia Biomédica. Desinfecção. Água ozonizada. Ultrassom. Instrumental cirúrgico

ABSTRACT

DISINFECTION OF SURGICAL INSTRUMENTS USING A HYDRODYNAMIC SYSTEM WITH OZONATED WATER AND ULTRASOUND

Surgical site infections are the most common infections acquired at hospitals, with *Staphylococcus aureus* being the main cause due to its ability to adhere to surgical instruments and biofilm formation. This study aimed to develop an innovative hydrodynamic system using ozonated water and ultrasound to disinfect surgical instruments. Scalpel handles experimentally contaminated with *S. aureus* were submitted to disinfection processes in the hydrodynamic system using ozonated water (2.14 mg/cm² (O₃) for 5 minutes), ultrasound (40 KHz, 50 W acoustic power for 5 minutes), and both associated techniques (3 mg/cm² for 7 min.). Microbiological tests were performed on scalpel handles and water, and FEG-SEM obtained images to evaluate its surface after the procedures. The results of the microbiological analysis showed that ozonated water produced effective disinfection of the scalpel handles with an applied ozone dosage of 2.14 mg/cm² in five minutes. However, the images showed that *S. aureus*, although inactivated, remained on the surface of the instruments. The ultrasound was not able to produce a microbicide effect in five minutes but showed an ability to remove microorganisms from the surface of the instruments. Ozonated water associated with ultrasound also indicated effective disinfection of the scalpel handles with an applied ozone dose of 3 mg/cm² in seven minutes, and the images showed that this disinfection time was sufficient to remove almost all the bacteria adhered to the surface of the instruments. These findings indicate that the hydrodynamic system is promising to disinfect surgical instruments with a sterilization potential, being necessary further studies are needed to verify this effect.

Key words: Biomedical Engineering. Disinfection. Ozonated water. Ultrasound. Surgical instruments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho da membrana de bactéria Gram-positiva	21
Figura 2: Geração de ozônio através do processo corona.....	25
Figura 3. Propagação de ondas de ultrassom em meio líquido	29
Figura 4. Reservatório principal.....	33
Figura 5. Sistema de desinfecção incluindo todos os acessórios.....	34
Figura 6. Indicação das regiões onde foram coletadas amostras da superfície do cabo de bisturi com o auxílio de um swab estéril	38
Figura 7. Curva de temperatura da água ao longo do tempo antes e após a refrigeração do sistema hidrodinâmico.....	40
Figura 8. Curva de concentração de ozônio dissolvido em água durante todo processo de desinfecção utilizando água ozonizada associada ao ultrassom.....	41
Figura 9. Imagens das amostras biológicas obtidas por MEV	44
Figura 12. Imagens das amostras biológicas obtidas por MEV-FEG	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das feridas cirúrgicas.....	20
Tabela 2: Classificação dos materiais cirúrgicos.....	22
Tabela 3: Parâmetro utilizados para cálculos com ozônio	26
Tabela 4: Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.....	27
Tabela 5: Efeitos tóxicos do gás ozônio em humanos	28
Tabela 6. Grupos experimentais realizados	36
Tabela 7. Descrição do protocolo de análise microbiológica da água.....	37
Tabela 8. Determinação de crescimento bacteriano na água durante o protocolo dos grupos 2, 3 e 4 ao longo do tempo.....	42
Tabela 9. Determinação do crescimento bacteriano nas regiões proximal, média e distal dos cabos de bisturi dos grupos 1, 2 e 3.....	43
Tabela 10. Determinação do crescimento bacteriano (turvação do meio TSB) dos cabos de bisturi contaminados experimentalmente em meio TSB	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC – Center for Diseases Control and Prevention
CITÉ – Centro de Inovação, Tecnologia e Educação
ECDC – European Center for Disease Prevention and Control
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
IDSA – Infectious Diseases Society of America
IRAS – Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde
ISC – Infecções do Sítio Cirúrgico
MEV-FEG – Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA – Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina
NO₂ – Dióxido de Nitrogênio
POL – Produtos de Oxidação Lipídica
ppmv – Partes por Milhão em Volume
PVC - Polyvinyl Chloride
S. aureus – Staphylococcus aureus
SHEA – Society for Healthcare Epidemiology of America
TSA – Tryptic Soy Agar
TSB – Tryptic Soy Broth
UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	INFECÇÕES DO SÍTIO CIRÚRGICO	19
3.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	20
3.3	INSTRUMENTAL CIRÚRGICO	22
3.4	OZÔNIO	23
3.4.1	Dosagem de ozônio.....	26
3.4.2	Mecanismo de ação do ozônio.....	26
3.4.3	Toxicidade do ozônio.....	28
3.5	ULTRASSOM	28
3.5.1	Ultrassom como agente microbicida	30
3.5.2	Ação do ultrassom na remoção de biofilme.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	TIPO DE PESQUISA.....	32
4.2	LOCAL DA PESQUISA	32
4.3	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA HIDRODINÂMICO	32
4.4	PROTOCOLO DE DESINFECÇÃO.....	36
4.5	CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DAS AMOSTRAS	36
4.6	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA.....	37
4.7	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DOS CABOS DE BISTURI	37
4.8	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DIRETA DOS CABOS DE BISTURI	38
4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MEV-FEG.....	39
5	RESULTADOS	40
5.1	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA.....	41
5.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DOS CABOS DE BISTURI	42
5.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DIRETA DOS CABOS DE BISTURI	43
5.4	ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA OZONIZAÇÃO E ULTRASSOM NA SUPERFÍCIE BACTERIANA UTILIZANDO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV-FEG)	44
6	DISCUSSÃO	46

7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

As infecções associadas aos cuidados de saúde podem levar a custos anuais, diretos e indiretos da ordem de US\$ 96 – 147 bilhões nos Estados Unidos (EUA) (SMITH et al., 2018). As infecções do sítio cirúrgico (ISC) são as infecções mais comuns adquiridas em hospitais e podem ser definidas de acordo com o *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), nos EUA, e o *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC), como infecções que ocorrem dentro de 30 dias após o procedimento cirúrgico ou dentro de 1 ano para implantes permanentes e, estão associadas com o aumento de morbidade e mortalidade, estadia hospitalar prolongada e aumento dos custos dos tratamentos (BADIA et al., 2017).

A incidência de ISC é estimada em cerca de 2-11 % para todas as intervenções cirúrgicas e, de acordo com estudos do ECDC, o principal agente causador dessas infecções é a bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo cerca de 50 % dos casos por sua cepa resistente à Meticilina (MRSA) (CDC, 2008; KOLASIŃSKI, 2018). *S. aureus* é uma das principais causas de endocardite, bacteremia, osteomielite e infecções da pele, do tecido mole e infecções associadas à assistência médica (TURNER et al., 2019).

De acordo com o CDC (2023), 65% das infecções causadas por *S. aureus* ocorrem devido a sua capacidade de adesão à instrumentos médicos e formação de biofilmes. Essa capacidade de produzir matriz extracelular e formar biofilme, torna o tratamento clínico, extremamente difícil (KARA TERKI et al., 2020).

Os instrumentais cirúrgicos são considerados itens críticos devido ao alto risco de infecção se estiverem contaminados por microrganismos, pois penetram tecidos estéreis e sistema vascular e devem ser esterilizados, sendo livres de todas as formas viáveis de microrganismos. Por serem artigos termo resistentes, devem ser submetidos à esterilização por vapor e alta pressão (ANVISA, 2004). Garantir a esterilização, é fundamental para que não haja transmissão de patógenos infecciosos aos pacientes (RUTALA; WEBER, 2004).

A presença de biofilme nos instrumentais cirúrgicos pode interferir no processo de desinfecção e esterilização, inclusive, mesmo os instrumentos passando por uma descontaminação manual e inspeção visual, estudos mostram que detritos ainda permanecem presentes em taxas que chegam a 91,7% (RESENDIZ et al., 2020).

Algumas proteínas altamente hidrofóbicas, como príons, responsáveis pela transmissão de doenças neurodegenerativas fatais incuráveis, são facilmente adsorvidos pela superfície do aço inoxidável cirúrgico e, apesar dos protocolos de desinfecção serem muito eficientes para a remoção de contaminantes microbiológicos, essas proteínas ainda podem ser mal removidas ou inativadas por estes métodos (HERVÉ; SECKER; KEEVIL, 2010; SECKER et al., 2020). Rutala e Weber (2019) enfatizam que a desinfecção e a esterilização garantem um uso seguro dos artigos médicos, e é essencial para prevenir infecções e o contato com agentes infecciosos.

O gás ozônio (O_3) é uma molécula composta por 3 átomos de oxigênio, que quando decomposto, produz radicais altamente reativos. Possui também uma boa solubilidade em água, que permite sua reação imediata com qualquer composto presente, podendo ser incorporado na água através do processo de difusão gasosa, por meio de difusores, bem como também por sistemas hidrodinâmicos atrelados a uma válvula Venturi (AWOYAMA et al., 2023; BOCCI, 2011; CARVALHO et al., 2023). O ozônio tem sido empregado como um agente germicida natural devido sua atividade oxidativa, degradando a estrutura da membrana celular e sua permeabilidade, através da oxidação de glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos, resultando em uma rápida morte por lise celular e a inibição da atividade respiratória e reprodutiva dos microrganismos (LOPES et al., 2015).

Estudos recentes têm demonstrado a eficiência do ozônio como agente microbicida e seu potencial uso como método de desinfecção devido a sua praticidade de manipulação, além de não apresentar risco aos seus manipuladores e não gerar resíduos tóxicos (AWOYAMA et al., 2023; DE OLIVEIRA et al., 2023; LOPES et al., 2015; MOREIRA FONSECA et al., 2021).

Além do ozônio, o ultrassom (US) tem sido empregado na limpeza de materiais cirúrgicos (MUSCAT et al., 2018). Os efeitos mecânicos do ultrassom em meio líquido são devidos aos processos de propagação das ondas acústicas e cavitação, onde as alterações de pressão produzidas causam a formação de microbolhas no meio líquido, que vão aumentando até implodirem, resultando no local em tempo muito curto, altas pressões (500-1000 atm) e temperatura que chega a quase 5000 °C (FETYAN; SALEM ATTIA, 2020).

Apesar dos efeitos da cavitação e propagação das ondas acústicas causarem ruptura das estruturas químicas que constituem o microrganismo, estudos

demonstram que o ultrassom demanda muito tempo de atuação a fim de atingir os microrganismos e inativá-los, porém, ele possui uma importante capacidade de removê-los das superfícies (LOPES et al., 2015; MOREIRA FONSECA et al., 2021; PASSOS et al., 2014). Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivo principal desenvolver um sistema hidrodinâmico utilizando água ozonizada e ultrassom para desinfecção de instrumentos cirúrgicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um equipamento que emprega um sistema hidrodinâmico com água ozonizada corrente associada ao ultrassom para a desinfecção de cabos de bisturi.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de desinfecção utilizando água ozonizada corrente associada ao ultrassom para a desinfecção de cabos de bisturi contaminados experimentalmente.
- Comparar a eficácia da inativação de *S. aureus* através de análises microbiológicas após o processo de desinfecção utilizando: somente água ozonizada, somente ultrassom e as duas técnicas associadas.
- Analisar a superfície dos cabos de bisturi por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) após os processos de desinfecção.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INFECÇÕES DO SÍTIO CIRÚRGICO

Na Grécia e Roma antigas, o tratamento de feridas já era praticado por Hipócrates, Celsus e Galeno. A presença de pus (secreção viscosa) na ferida era considerada sinal de uma cicatrização normal e Hipócrates dizia que quando o pus apresentava aspecto branco e não era feio, a saúde prevalecia, porém, se o pus apresentasse um aspecto diferente e turvo, a morte acontecia (KOLASIŃSKI, 2018).

As Infecções do Sítio Cirúrgico são aquelas infecções decorrentes do local do procedimento cirúrgico e são as complicações mais comuns após uma cirurgia, ocorrendo em cerca de 3 % a 20 % dos procedimentos realizados. Elas são consideradas as Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) mais comuns e de maior custo, pois além de serem uma ameaça à segurança do paciente, podem ainda causar prejuízos físicos e psicológicos, podem prolongar a estadia hospitalar, aumentar a chance de readmissão hospitalar e a necessidade de cirurgias adicionais (SAVAGE; ANDERSON, 2013; EBSEH, 2019).

Nos EUA, dados publicados em 2014 pela *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) e pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) mostram que a ISC compromete de 2 % a 5 % dos pacientes que receberam procedimentos cirúrgicos e que, a cada ano, ocorrem de 160.000 a 300.000 casos de ISC no país. No Brasil, a infecção do sítio cirúrgico ocupa a terceira posição entre todas as infecções em serviços de saúde, sendo de 14 a 16 % encontradas em pacientes hospitalizados. Em 1999, um estudo do Ministério da Saúde apontou uma taxa de ISC de 11 % do total de procedimentos cirúrgicos analisados (ANVISA, 2017).

De acordo com o *Center for Diseases Control and Prevention* nos Estados Unidos, as ISC pode ser classificada como:

- Superficial: se desenvolve em até 30 dias do procedimento cirúrgico e envolve a pele e o tecido subcutâneo.
- Profunda: se desenvolve após 30 dias do procedimento cirúrgico ou em até 1 ano da colocação de um implante e envolve a fáscia e músculos.

- Infecção de órgão ou cavidade corporal próximo ao local do procedimento cirúrgico: se desenvolve em até 30 dias do procedimento cirúrgico ou em até 1 ano da colocação de um implante.

As graves consequências aos pacientes que desenvolvem essas infecções determinam a necessidade da criação de estratégias para a prevenção dessa infecção. Nesse sentido, a identificação dos fatores de risco para ISC contribui para a promoção de ações que minimizem esse tipo de complicação pós-operatória (CARVALHO et al., 2017).

Também de acordo com o CDC, as feridas cirúrgicas são tradicionalmente classificadas baseado em quão limpas ou contaminadas elas são (Tabela 1):

Tabela 1. Classificação das feridas cirúrgicas.

Classificação	Tipo de ferida	Risco de infecção	Exemplo de cirurgias
Classe I	Limpa	< 2 %	Laparotomia, ressecção mamária, intervenções vasculares.
Classe II	Limpa/contaminada	< 10 %	Colecistectomia eletiva, ressecção do intestino delgado, laringectomia.
Classe III	Contaminada	20 %	Apendicite aguda, colecistite gangrenosa.
Classe IV	Suja/infectada	> 40 %	Feridas traumáticas infectadas, abscessos.

Fonte: Adaptado de Kolasinski (2018)

De acordo com estudos do ECDC, a bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tem se tornado a causa mais comum de infecções do sítio cirúrgico, sendo cerca de 50 % dos casos causados por sua cepa resistente à Meticilina (MRSA) (ANDERSON et al., 2015; TURNER et al., 2019).

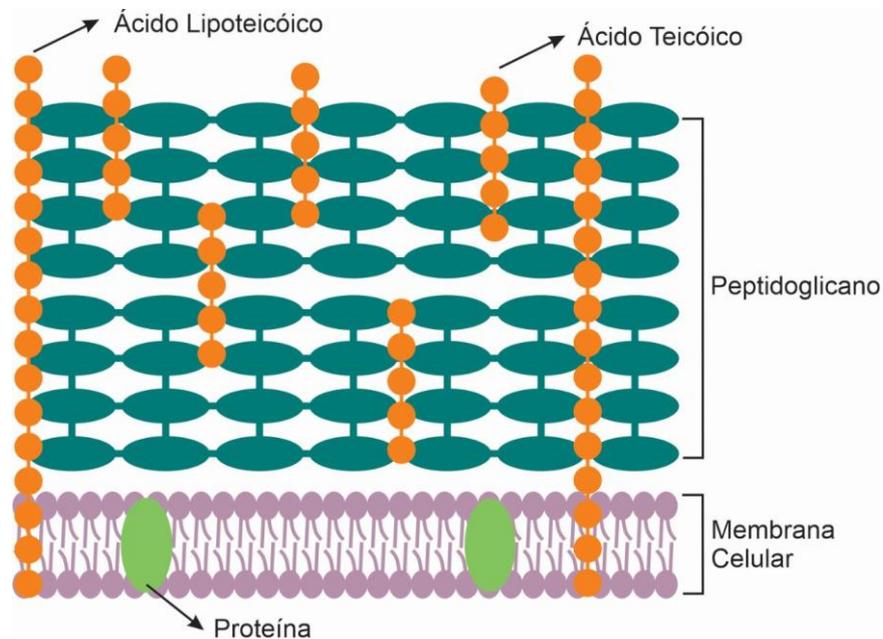
3.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Em 1882, o cirurgião britânico Alexander Ogston foi o primeiro a interpretar corretamente causa da supuração aguda em humanos; ele descobriu que esse processo era causado por *Micrococcus*, bactérias com células esféricas, gram-

positivas. Havia dois tipos, um que tendia a formar pares ou cadeias, já denominado como *Streptococcus* e outro, que se apresentava em aglomerados, que ele atribuiu o nome de *Staphylococcus*, derivado do grego *staphyle*, que significa cacho de uvas. Ogston injetou *Micrococcus* em animais e se a intoxicação sanguínea ocorreu neles, seguiu-se uma infecção localizada do tecido. Essa informação aplicada nas cirurgias sugeriu que as infecções pós-operatórias eram uma seqüela da supuração das feridas (LYELL ALAN, 1989; OGSTON, 1984).

S. aureus é uma bactéria gram-positiva, unicelular, esférica, que não forma esporos, e possui membrana plasmática formada por uma bicamada fosfolipídica. Sua parede celular possui espessura de 20 a 50 nm, sendo mais espessa que a parede celular das bactérias gram negativas e é formada por múltiplas camadas de peptidoglicano, proporcionando uma estrutura extremamente forte em tensão. Ligado à parede celular, há uma quantidade significativa de ácidos teicóicos que lhe conferem maior rigidez e ácidos lipoteicóicos, que lhe proporciona aderência (FOSTER et al., 2014).

Figura 1. Desenho da membrana de bactéria Gram-positiva.



Fonte: Autor

Na maior parte do tempo, a bactéria *S. aureus* não é prejudicial, podendo ser encontrada na região nasal em cerca de 30% das pessoas, porém em unidades de saúde, por causar infecções sérias e fatais, como por exemplo bacteremia (presença

de bactérias no sangue), pneumonia (infecção nos alvéolos pulmonares), endocardite (inflamação na membrana que reveste a parede interna do coração) e osteomielite (inflamação nos ossos) (CDC, 2011).

Foi uma das primeiras bactérias controladas por antibióticos, como a penicilina em 1940, mas tornou-se uma das mais importantes de infecções hospitalares e comunitárias devido ao seu potencial de evolução e adaptação (AL-ALI et al., 2014).

Doenças agudas e crônicas causadas por *S. aureus* ocorrem principalmente pela sua capacidade de adesão à instrumentos médicos e formação de biofilmes. De acordo com o CDC, 65 % das infecções bacterianas ocorrem devido a presença de biofilmes (KARA TERKI et al., 2020).

Biofilme é uma comunidade complexa de microrganismos que estão irreversivelmente ligados à uma superfície e incorporados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares. Ele é considerado a forma mais predominante de desenvolvimento de bactérias na natureza e pode ser formado na superfície da maioria dos materiais biológicos e não biológicos (LOPES et al., 2019).

3.3 INSTRUMENTAL CIRÚRGICO

Em 1968, Spaulding desenvolveu uma classificação racional para a desinfecção e esterilização de artigos médicos. Esse sistema de classificação é tão claro e lógico que foi refinado e mantido até hoje para planejar métodos para desinfecção e esterilização. Os materiais cirúrgicos foram classificados como artigos críticos, semicríticos e não críticos, conforme demonstrado na Tabela 2 (ANVISA, 2010).

Tabela 2. Classificação dos materiais cirúrgicos.

Classificação	Utilização	Processo
Críticos	Procedimentos de alto risco que penetram tecidos ou órgãos	Esterilização
Semicríticos	Entram em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa do paciente	Desinfecção de alto nível
Não críticos	Entram em contato com a pele intacta	Desinfecção de baixo nível

Fonte: ANVISA (2010)

A desinfecção é considerada um processo físico ou químico que destrói a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos inanimados e superfícies. Na desinfecção de baixo nível, há a eliminação de bactérias vegetativas e de alguns vírus e fungos, enquanto na desinfecção de alto nível, todos os microrganismos são eliminados, com exceção de esporos bacterianos. A esterilização, no entanto, é um processo validado que serve para fazer um artigo crítico e/ou semicrítico livre de todas as formas viáveis de microrganismos (ANVISA, 2010).

Os instrumentais cirúrgicos são considerados artigos críticos, pois penetram tecidos ou órgãos e requerem esterilização para o seu uso (ANVISA, 2010).

Rutala e Weber (2019) enfatizam que a desinfecção e a esterilização garantem a utilização segura de dispositivos médicos e são essenciais para prevenir infecções. No entanto, a presença de biofilme em instrumentos cirúrgicos pode afetar o processo de desinfecção e esterilização, embora passem por inspeção visual, estudos mostraram que resíduos ainda estão presentes em níveis tão altos que chegam a 91,7 % (RESENDIZ et al., 2020).

Algumas proteínas altamente hidrofóbicas, como príons, responsáveis pela transmissão de doenças neurodegenerativas fatais incuráveis, são facilmente adsorvidos pela superfície do aço inoxidável cirúrgico e, apesar dos protocolos de desinfecção serem muito eficientes para a remoção de contaminantes microbiológicos, essas proteínas são mal removidas ou inativadas por estes métodos (HERVÉ; SECKER; KEEVIL, 2010; SECKER et al., 2020). Com base nessas informações, novas técnicas e procedimentos mais eficientes para limpeza e desinfecção se tornam essenciais.

3.4 OZÔNIO

Em 1840, o químico germano-suíço Christian Friedrich Schonbein (1799-1868) enquanto trabalhava com uma pilha voltaica na presença de oxigênio, notou o surgimento de um gás com um "cheiro elétrico e pungente" que poderia ser uma espécie de "oxigênio superativo". Ele nomeou então esse gás de ozônio, derivado da palavra grega para cheiro, *ozein* (RUBIN, 2001).

Somente em 1856, o físico-químico irlandês Thomas Andrews (1813-1885) demonstrou que o ozônio é formado somente por moléculas de oxigênio, apresentando sua identificação química estrutural. Em 1863, o químico suíço

Jacques-Louis Soret (1827-1890) estabeleceu a relação entre o ozônio e o oxigênio, demonstrando que três volumes de oxigênio produziam dois volumes de ozônio (RUBIN, 2001).

O gás ozônio é naturalmente encontrado na estratosfera terrestre (camada de ozônio), atuando como uma camada de proteção, pois absorve parte da radiação ultravioleta (UV) emitida pelo Sol (Mecanismo de Chapman), responsável por mutações genéticas e desenvolvimento de câncer. A radiação UV catalisa a produção de ozônio, que então controla a irradiação UV, protegendo os sistemas biológicos da Terra (BOCCI, 2011).

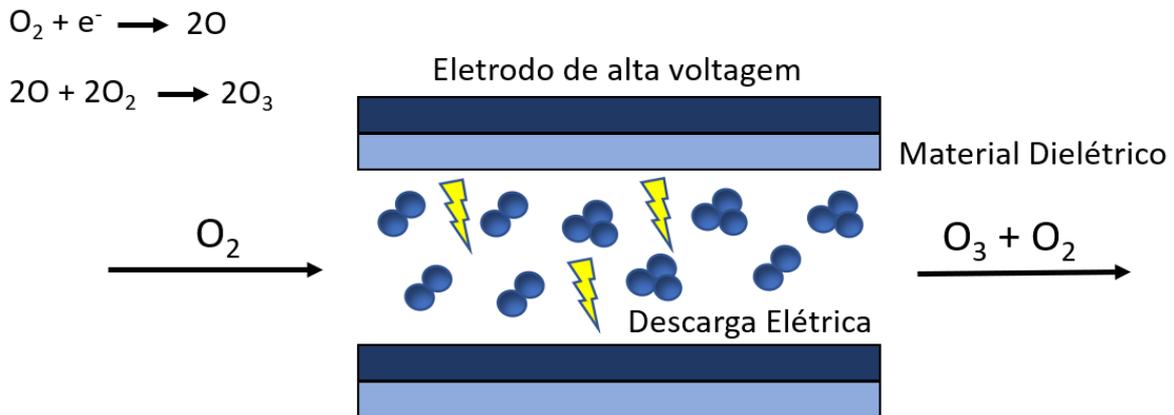


Essa camada de proteção da Terra se mantém constante devido ao equilíbrio dinâmico entre a formação de ozônio e sua dissociação natural. Como o ozônio é termodinamicamente instável, não pode ser estocado, sendo necessário seu uso imediato, quando não vinculado a algum meio.

Em 1857, na Alemanha, o conceito que o ozônio deriva do oxigênio quando uma descarga elétrica é gerada foi aplicado pelo químico Werner von Siemens, que inventou o chamado tubo de super indução (tubo da Siemens), consistindo em duas placas de eletrodos interpostos ajustadas em uma alta tensão que, na presença de oxigênio, poderia gerar ozônio (BOCCI, 2011).

No sistema definido como ozonizador de descarga corona, o ozônio é formado quando o oxigênio passa por uma lacuna entre dois eletrodos metálicos submetidos à alta tensão, criando um campo de alta energia denominado corona. A energia criada pela descarga elétrica favorece a quebra das moléculas de oxigênio em átomo de oxigênio, que formam a molécula tri atômica de ozônio, demonstrado na Figura 2 (BOCCI, 2011).

Figura 2. Geração de ozônio através do processo corona.



Fonte: Adaptado de Sarron; Gadonna-Widehem; Aussenac (2021)

A concentração de ozônio obtida através da descarga corona é determinada por três parâmetros principais:

- Tensão elétrica: a concentração final de ozônio aumenta com a tensão de forma não proporcional.
- Espaçamento entre os eletrodos: serve para modular um aumento gradual da concentração de ozônio.
- Fluxo de oxigênio: expresso como volume (litro) por minuto. A concentração final de ozônio é inversamente proporcional ao fluxo de oxigênio.

Para a produção de ozônio com fins terapêuticos, é mais adequado utilizar oxigênio puro, uma vez que o ar atmosférico gera subprodutos, como o dióxido de nitrogênio (NO_2), que é altamente reativo com o tubo de descarga corona e com os sistemas biológicos (BOCCI, 2011).

O gás ozônio possui também uma boa solubilidade em água, que permite sua reação imediata com qualquer composto presente, podendo ser incorporada através do processo de difusão gasosa por meio de difusores, bem como por sistemas hidrodinâmicos atrelados a uma válvula Venturi (BOCCI, 2011; CARVALHO et al., 2015).

A estabilidade da molécula de gás ozônio depende da temperatura, em $20\text{ }^\circ\text{C}$ a concentração de ozônio é reduzida pela metade em 40 minutos, em $30\text{ }^\circ\text{C}$ essa

redução ocorre em 25 minutos, enquanto em -50 °C a concentração se reduz pela metade somente após 3 meses (BOCCI, 2011).

3.4.1 Dosagem de ozônio

De acordo com Rakness et al (1997), a forma mais comum para mensurar a Taxa (T) de produção de ozônio [mg/min] é multiplicar a Concentração (C) de ozônio [$\mu\text{g/mL}$ ou mg/ml] pela Taxa de Fluxo (Q) de gás oxigênio [L/min].

A quantidade em massa de ozônio (m) [mg ou g] inserida no sistema pode ser encontrada multiplicando-se a taxa de produção de ozônio (T) [mg/min] pelo tempo de exposição ao gás ozônio (t) [min ou h]. A dosagem de ozônio aplicada (D) [mg/cm²] pode ser calculada dividindo-se a quantidade de ozônio em massa (m) [mg ou g] pela área da superfície exposta ao ozônio (A) [cm²] (Tabela 3) (VAN LEEUWEN, 2015).

Tabela 3. Parâmetros utilizados para cálculos com ozônio.

Parâmetros	Cálculo	Unidade
Taxa de Produção de ozônio (T)	$T = C \times Q$	mg/min
Quantidade de ozônio em massa (m)	$m = T \times t$	mg ou g
Dosagem de ozônio aplicada (D)	$D = m / A$	mg/cm ²

Fonte: Autor

3.4.2 Mecanismo de ação do ozônio

Durante a 1^a guerra mundial, o ozônio foi utilizado para tratamento de gangrena pós-traumática em soldados alemães. A ideia de se utilizar o ozônio na prática médica, durante o século passado, foi estimulada pelas propriedades desinfetantes do ozônio e pela falta de antibióticos. Em 1935, o dentista suíço Edward Fish foi o primeiro a utilizar o ozônio na prática clínica. Em 1936, na França, o Dr. Aubourg propôs a insuflação retal de ozônio para tratamento de colite crônica e fístulas (BOCCI, 2011; RUBIN, 2001).

Devido à sua atividade oxidativa, o ozônio é considerado o segundo agente mais oxidativo, perdendo apenas para o flúor (Tabela 4), o que o torna um poderoso composto para ser utilizado como desinfetante (DA SILVA et al., 2011).

Tabela 4. Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Da Silva et al. (2011)

A redução da quantidade ou inativação dos microrganismos pelo ozônio, depende de sua concentração, tempo de aplicação e do microrganismo envolvido. Ele é eficaz na inativação de bactérias, bolores, leveduras, vírus, protozoários, incluindo as formas esporuladas e cistos de protozoários, que são mais resistentes (DA SILVA et al., 2011).

A inativação de microrganismos pelo ozônio se dá inicialmente pela oxidação de glicolípídios, glicoproteínas e aminoácidos, resultando em uma rápida morte pela lise. O ozônio ataca também grupos sulfidríla de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos (DA SILVA et al., 2011).

Atualmente, o potencial do gás ozônio e da água ozonizada como agente microbicida tem sido amplamente estudado. O trabalho de Megahed, Aldridge, Lowe (2018) verificou a eficácia do gás e da água ozonizada para desinfecção de superfícies contaminadas com esterco de gado, concluindo que a água ozonizada foi mais eficaz que o gás ozônio, em superfícies lisas e moderadamente rugosas, porém ambas não foram efetivas na redução bacteriana em superfícies complexas, como a madeira.

Taba et al. (2023) verificaram que o gás ozônio associado à baixa pressão se mostrou eficaz na inativação de *S. aureus* em agulhas de sutura. Oliveira et al. (2023) demonstraram que a utilização de água ozonizada para desinfecção de mesa de instrumental cirúrgico se mostrou mais efetiva que álcool 70%, com uma porcentagem de eficácia de 98,1 % e 86,5 % respectivamente.

Awoyama et al. (2022) através de um sistema hidrodinâmico, promoveram a desinfecção de membrana amniótica humana com uma concentração mínima de 2.7 mg/L de ozônio dissolvido em água, em 10 minutos. Carvalho et al. (2023), também

através de um sistema hidrodinâmico utilizando água ozonizada, promoveram a desinfecção de alto nível de endoscópio com uma dosagem de ozônio aplicada de 3.9 g/cm², reduzindo o tempo de desinfecção convencional por glutaraldeído de 30 minutos, para apenas 15 minutos.

3.4.3 Toxicidade do ozônio

O gás ozônio quando inalado pode ser perigoso, devido sua alta toxicidade ao ser humano. Os sintomas e alterações patológicas devido a respiração prolongada do ar contaminado com o ozônio são resumidos na Tabela 5 (BOCCI, 2011):

Tabela 5. Efeitos tóxicos do gás ozônio em humanos.

Concentração de O ₃ no ar (ppmv)	Efeitos tóxicos
0.1	Lacrimejamento e irritação das vias respiratórias superiores.
1.0 – 2.0	Rinite, tosse, dor de cabeça e ocasionalmente náusea e ânsia de vômito. Indivíduos predispostos podem desenvolver asma.
2.0 – 5.0 (10-20 min)	Aumento progressivo da dispneia, espasmo brônquico, dor retroesternal.
5.0 (60 min)	Edema pulmonar agudo e, ocasionalmente, paralisia respiratória.
10.0	Morte em 4 horas
50.0	Morte em poucos minutos

Fonte: Adaptado de Bocci (2011)

3.5 ULTRASSOM

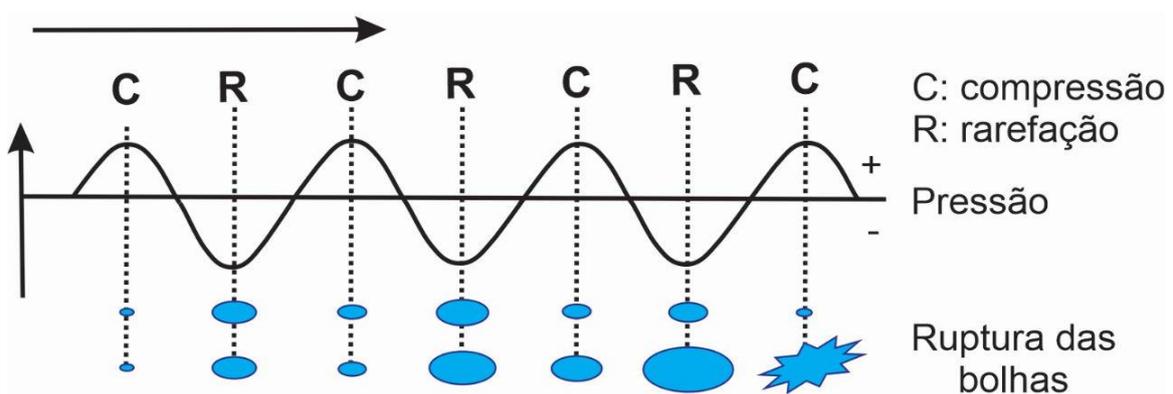
Com a descoberta do efeito piezoelétrico pelos irmãos Pierre e Jacques Curie na França, em 1880, a base para a geração atual do ultrassom foi desenvolvida. Após 15 anos, em 1895, Thornycrof e Sidney descreveram primeiramente e documentaram o fenômeno de cavitação. Em 1928, Harvey e Loomis publicaram seu primeiro estudo sobre o uso do ultrassom como desinfetante e, somente em 1945, a compreensão do fenômeno da cavitação evoluiu em conjunto com desenvolvimentos significativos de circuitos eletrônicos e transdutores (FETYAN; SALEM ATTIA, 2020).

O som pode ser representado como energia mecânica transmitida em gás, líquido ou sólido, na forma de ondas pressurizadas. O ultrassom, é uma pressão sonora cíclica, que atinge o limite superior da audição humana (20 KHz), que pode ser

gerado pela técnica piezoelétrica, onde a energia elétrica é convertida à energia de alta frequência por cristais piezoelétricos ligados à uma peça vibratória. A maioria dos equipamentos modernos de ultrassom são baseados em transdutores com esse tipo de material (GOGATE, 2007).

Os efeitos mecânicos do ultrassom em meio líquido são devidos ao processo de cavitação (Figura 3). O aumento da pressão acústica proporciona a formação de milhares de microbolhas no meio líquido, que vão aumentando de tamanho. Durante o ciclo de rarefação, essas bolhas se estendem e entram em colapso durante a compressão ultrassônica, gerando “*hot spots*” com jatos de alta velocidade (300-1000 m/s), temperatura (3000-5000 K) e pressão (entre 500 e 10000 atm) em um período de tempo muito curto (microsegundo) (FETYAN; SALEM ATTIA, 2020; GOGATE, 2007; PASSOS et al., 2014).

Figura 3. Propagação de ondas de ultrassom em meio líquido.



Fonte: Adaptado de Fetyan; Salem Attia (2020)

O processo de propagação das ondas acústicas é um fluxo fluido causado pela transferência da onda acústica para o líquido em que está se propagando, com um intervalo até da ordem de centímetros (VYAS et al., 2019).

O processo de cavitação pode promover a formação de radicais hidroxila (OH) e hidrogênio (H⁺), produzindo um processo de oxidação dos compostos orgânicos dissolvidos no meio (FETYAN; SALEM ATTIA, 2020).

3.5.1 Ultrassom como agente microbicida

A cavitação tem demonstrado produzir tensões de cisalhamento suficientes para causar a ruptura da membrana celular dos microrganismos. O mecanismo exato de como ela proporciona a inativação dos microrganismos ainda não foi estabelecido de forma conclusiva, embora seja uma combinação dos seguintes mecanismos de ação (GOGATE, 2007; PASSOS et al., 2014):

- Efeitos mecânicos: geração de turbulência, circulação de líquido e tensões de cisalhamento.
- Efeitos químicos: geração de radicais livres.
- Quando utilizada combinada com outros tratamentos químicos (cloro, peróxido de hidrogênio e ozônio), o intenso gradiente de pressão melhora a penetração desses agentes químicos oxidantes através da membrana celular. A cavitação também auxilia na remoção dos microrganismos aglomerados, aumentando a eficácia dos outros agentes químicos.

Estudos tem observado que os efeitos mecânicos são os principais responsáveis pela inativação de microrganismos, enquanto os efeitos químicos e de aquecimento apenas auxiliam o processo (MASON et al., 2003).

Fatores relacionados às células dos microrganismos também afetam a eficiência microbicida do ultrassom (GOGATE, 2007):

- Tamanho da célula: células maiores, como células em processo de divisão experimentam mais tensão de tração do que as células menores.
- Formato da célula: células maiores e mais alongadas são mais suscetíveis aos efeitos de cavitação do que células menores e mais compactas.
- Estágio de desenvolvimento: células diplóides (em divisão celular) são mais suscetíveis à morte do que células em fase estacionária.
- Espécie: algumas espécies, como por exemplo *Pseudomonas spp.* apresentam resistência ao tratamento por ultrassom.

3.5.2 Ação do ultrassom na remoção de biofilme

Além do efeito microbicida, o ultrassom também tem um papel muito importante na remoção do biofilme. Durante o processo de cavitação, há a formação de nuvens de cavitação (aglomerados de microbolhas). Se esta nuvem estiver em contato com o biofilme, os jatos dentro dela são direcionados para as bolhas circundantes, auxiliando na remoção do biofilme. As ondas de choque formadas pelo colapso das bolhas também contribuem para a limpeza da superfície, fragmentando o biofilme. A propagação das ondas acústicas atinge a superfície a ser limpa perpendicularmente, também auxiliando nesse processo (VYAS et al., 2019).

O ultrassom associado a outras técnicas como a cavitação hidrodinâmica, tem sido utilizado para aumentar a ozonização e reduzir o tempo de desinfecção e degradação de contaminantes em efluentes (WU et al., 2012, 2016).

O aprimoramento que o ultrassom fornece à eficiência da ozonização é geralmente atribuído a dois mecanismos físico-químicos:

- Decomposição de ozônio pelo ultrassom devido ao aumento da atividade dos radicais livres;
- O tratamento simultâneo do ultrassom e do ozônio aumenta o coeficiente de transferência de massa volumétrica em fase líquida.

Ambos os mecanismos melhoram a transferência de ozônio entre gás e líquido, bem como a utilização do ozônio. A degradação do ozônio pelo ultrassom faz com que sua concentração na água diminua, permitindo assim que mais ozônio seja difundido na solução.

Estudos tem demonstrado que o uso do ultrassom associado ao ozônio tem demonstrado um grande potencial microbicida. Passos et al. (2014) realizaram uma análise comparativa dos efeitos do ozônio e ultrassom na eliminação de cistos de *Giardia ssp.* de águas residuais. Os resultados obtidos mostraram que as duas técnicas promoveram uma eliminação eficiente dos cistos, porém quando combinadas, o efeito foi mais acentuado.

Moreira Fonseca et al. (2015) avaliaram a desinfecção de instrumentos odontológicos contaminados com *Streptococcus Mutans*, utilizando água ozonizada sozinha e combinada com ultrassom. Eles também verificaram que as duas técnicas foram eficazes, porém quando combinadas, obtiveram melhores resultados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de uma pesquisa experimental, laboratorial e comparativa. Foi realizado um estudo *in vitro*, com análise microbiológica para avaliar a inativação de *S. aureus* em cabos de bisturi contaminados experimentalmente.

4.2 LOCAL DA PESQUISA

O protocolo experimental foi realizado no Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ). Para o desenvolvimento do sistema de desinfecção, foi utilizado o Laboratório de Apoio Mecânico, para a contaminação microbiológica dos cabos de bisturi e avaliação dos protocolos de desinfecção foram utilizados os Laboratórios de Biotecnologia e Desinfecção e Esterilização.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA HIDRODINÂMICO

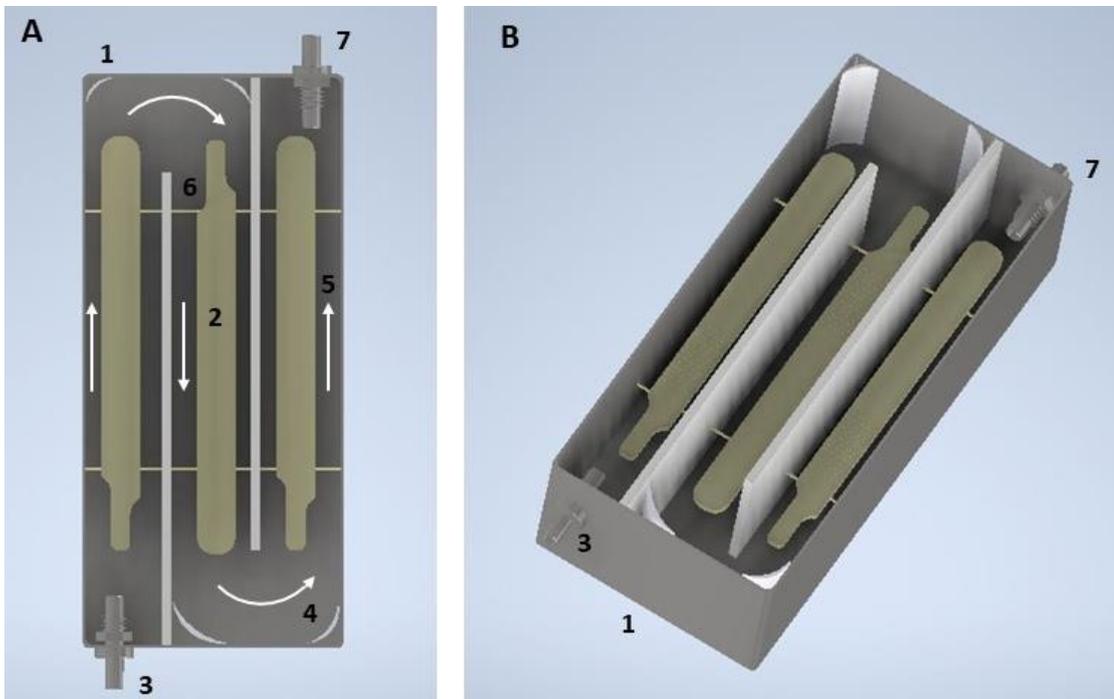
Foi desenvolvido um sistema, utilizando a ação hidrodinâmica da água ozonizada associada ao ultrassom para a desinfecção de cabos de bisturi contaminados experimentalmente. Como a dissociação do ozônio gera radicais altamente oxidativos, para a fabricação do protótipo foram escolhidos materiais inertes ao ozônio, de modo a evitar reações de oxidação e a geração de subprodutos que pudessem interferir no processo de desinfecção.

A atividade vibracional do cristal piezoelétrico gera um aumento de temperatura no transdutor de ultrassom, que combinado com a cavitação, promove um aumento de temperatura da água do sistema. Como a temperatura é um fator importante para a estabilidade do ozônio, foi instalado um sistema de refrigeração com ventoinhas e placa Peltier para evitar o aumento da temperatura da água durante o processo de desinfecção. A temperatura da água foi monitorada ao longo do tempo, antes e após a refrigeração do sistema hidrodinâmico.

A Figura 4 demonstra o reservatório principal do sistema, por onde a água ozonizada flui e onde foi realizada a descontaminação dos cabos de bisturi (1). No

interior desse reservatório foi construído com um circuito em geometria sinuosa para criar um fluxo de água, auxiliando na limpeza dos objetos (5). Com o intuito de favorecer a dinâmica da água e evitar a formação de redemoinhos, foram inseridas, nos cantos do reservatório, placas de PVC (*Polyvinyl Chloride*) curvadas, formando um raio longo para a curvatura (4). Foram instalados dois fios de nylon (6) com espessura de 0,3 mm no fundo do reservatório principal para que os cabos de bisturi (2) pudessem ser apoiados com a mínima área de contato possível, a fim de evitar acúmulo de bactéria na região e favorecer a desinfecção.

Figura 4. Reservatório principal.

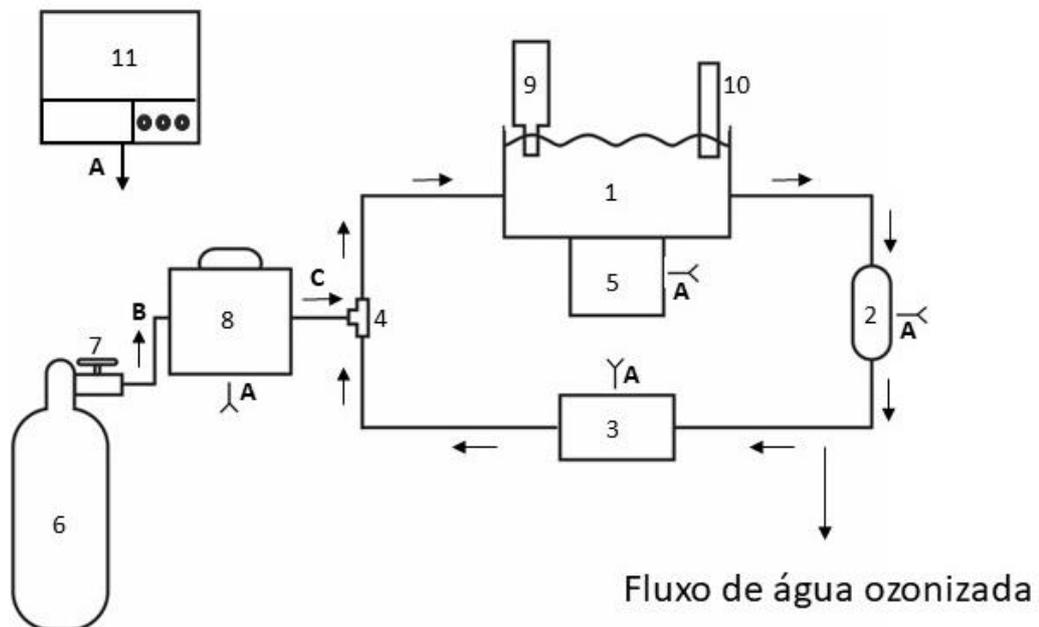


A. Vista superior do reservatório principal: (1) reservatório principal, (2) cabos de bisturi, (3) entrada de água ozonizada, (4) pás, (5) circuito de água corrente, (6) fios de nylon para suporte dos cabos de bisturi, (7) saída de água ozonizada. B. Vista em perspectiva do reservatório principal. Fonte: Autor

A Figura 5 demonstra o sistema hidrodinâmico incluindo todos os seus acessórios. A água escoá do reservatório principal (1) através de uma bomba centrífuga, que operou com uma vazão de $1.300 \text{ cm}^3/\text{min}$ (2) e passa por um sistema de resfriamento utilizando uma placa Peltier (3). A água é então escoada num injetor Venturi (4), a qual na sua terceira via há a inserção do gás ozônio para a mistura com a água e então retorna ao reservatório principal, fechando assim o circuito hidráulico.

Um gerador de ultrassom com cristal piezoeletrico (40 KHz, 50 W acústicos) e ventoinhas acopladas (5) para refrigeração foi instalado abaixo do reservatório principal. Um cilindro com oxigênio (6) foi acoplado a uma válvula reguladora de fluxo (7) para que a vazão de oxigênio fosse controlada em 0,25 L/min. O gerador de ozônio (MS3G, MS Ltda, Brazil) (8), foi ajustado a uma concentração de 48 mg/L e para monitorar todo o processo de desinfecção foram imersos sensores no reservatório principal para medir a concentração de ozônio dissolvido na água (DOZ30, Clean®) (9) e a temperatura (10).

Figura 5. Sistema de desinfecção incluindo todos os acessórios



- A – Controle eletrônico
- B – Oxigênio (O_2)
- C – $O_2 + O_3$

(1) reservatório principal, (2) bomba centrífuga, (3) Sistema de refrigeração com placa Peltier, (4) injetor Venturi, (5) cabeçote ultrassom com cristal piezoeletrico e ventoinhas, (6) cilindro de oxigênio, (7) válvula reguladora de fluxo, (8) gerador de ozônio, (9) sensor de concentração de ozônio na água, (10) sensor de temperatura, (11) controle eletrônico para ativar e controlar todo o sistema. Fonte: Autor

Com a determinação do ajuste da vazão da bomba centrífuga (Q) em 1.300 cm³/min e da área do reservatório principal (A) de 10,5 cm², por onde a água fluiu, foi possível calcular a velocidade média da água (V) no reservatório principal:

$$Q [\text{cm}^3/\text{min}] = A [\text{cm}^2] \times V [\text{cm}/\text{min}]$$

$$V = 1300 \text{ cm}^3/\text{min}^{-1} / 10,5 \text{ cm}^2$$

$$\mathbf{V = 2 \text{ cm/s}}$$

Foi possível também, de acordo com os dados informados acima, medir a taxa de produção de ozônio para cada tempo de exposição, e a partir disso, determinar a quantidade em massa de ozônio entregue, e as dosagens de ozônio aplicadas nos cabos de bisturi.

Considerando a vazão do cilindro de oxigênio = 0,25 L/min e a concentração de O₃ = 48 mg/L, a Taxa de produção de ozônio foi:

$$T [\text{mg}/\text{min}] = C [\text{mg}/\text{L}] \times Q$$

$$T = 48 \text{ mg}/\text{L} \times 0,25 \text{ L}/\text{min}$$

$$\mathbf{T = 12 \text{ mg}/\text{min}}$$

Considerando a taxa de produção de O₃ = 12 mg/min e o tempo de exposição ao ozônio do grupo 2 de 7 minutos e do grupo 3 de 5 minutos, a quantidade de O₃ em massa aplicada foi:

$$m_{\text{grupo2}} [\text{mg}] = T [\text{mg}/\text{min}] \times t_{07} [\text{min}]$$

$$m_{\text{grupo2}} = 12 \text{ mg}/\text{min} \times 7 \text{ min}$$

$$\mathbf{m_{\text{grupo2}} = 84 \text{ mg}}$$

$$m_{\text{grupo3}} [\text{mg}] = T [\text{mg}/\text{min}] \times t_{05} [\text{min}]$$

$$m_{\text{grupo3}} = 12 \text{ mg}/\text{min} \times 5 \text{ min}$$

$$\mathbf{m_{\text{grupo3}} = 60 \text{ mg}}$$

Considerando que o cabo de bisturi possui uma área de superfície exposta ao O₃ de 28 cm², a Dosagem de ozônio aplicada para os grupos 2 e 3 foi:

$$D_{\text{grupo2}} [\text{mg}/\text{cm}^2] = m_{\text{grupo2}} [\text{mg}] / A [\text{cm}^2]$$

$$D_{\text{grupo2}} = 84 \text{ mg} / 28\text{cm}^2$$

$$D_{\text{grupo2}} = \mathbf{3 \text{ mg}/\text{cm}^2}$$

$$D_{\text{grupo3}} [\text{mg}/\text{cm}^2] = m_{\text{grupo3}} [\text{mg}] / A [\text{cm}^2]$$

$$D_{\text{grupo3}} = 60 \text{ mg} / 28\text{cm}^2$$

$$D_{\text{grupo3}} = \mathbf{2,14 \text{ mg}/\text{cm}^2}$$

4.4 PROTOCOLO DE DESINFECÇÃO

Todo o protocolo experimental foi realizado em ambiente climatizado, com temperatura de 20 °C. Foi utilizada água deionizada estéril à 18 °C. Com o intuito de se obter a saturação da concentração de ozônio (mg/L) dissolvido na água e produzir desinfecção em todo circuito interno hidrodinâmico, o sistema de ozonização atuou previamente durante 10 minutos. Após esse período, os cabos de bisturi foram introduzidos no reservatório principal, iniciando o processo de desinfecção.

Foram definidos 4 grupos amostrais, demonstrados na Tabela 6. Para cada grupo foram utilizados 15 cabos de bisturi contaminados experimentalmente.

Tabela 6. Grupos experimentais realizados

Grupos	Descrição do protocolo
Grupo 1	Controle (não foi submetido à desinfecção)
Grupo 2	O ₃ +US (5 minutos) + O ₃ (2 minutos)
Grupo 3	O ₃ (5 minutos)
Grupo 4	US (5 minutos)

O₃+US = ozônio associado ao ultrassom; O₃ = ozônio; US = ultrassom. Fonte: Autor

4.5 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DAS AMOSTRAS

Para a contaminação experimental, cepas de *S. aureus* (CCCD S013), foram cultivadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar - Liofilchem®) e incubadas por 24 horas à 37 °C para serem utilizadas no preparo de suspensões bacterianas. As suspensões bacterianas foram preparadas com a transferência de colônias de *S. aureus* em solução de cloreto de sódio 0,9 % estéril para obtenção da concentração ajustada pela turbidez, baseada na escala nefalométrica de McFarland entre 0,2 e 0,25 (equivalente

a 10^7 UFC/mL). Para leitura da turbidez, foi utilizado um turbidímetro (Plus, Alfakit, Florianópolis, Brasil), calibrado com água ultrapura e verificado com os padrões 0,5 e 4,0 McFarland. Após o ajuste da concentração, a suspensão foi diluída para obtenção de uma concentração final de 10^6 UFC/mL.

Os cabos de bisturi foram inseridos em um recipiente de vidro estéril e homogeneamente inoculados com 300 mL da suspensão bacteriana, que foi incubada por 30 minutos em estufa à 37 °C. Após o período de incubação, os cabos de bisturi foram colocados para secagem em um suporte de aço inoxidável estéril por 30 minutos em temperatura ambiente (22 °C) em seguida, submetidos à desinfecção.

4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

Para a análise microbiológica, foi coletado 0,1 mL de água do reservatório principal em triplicata (total de 15 amostras), durante os processos de desinfecção. As amostras foram semeadas em meio TSA pelo método de espalhamento em placa e incubadas em estufa à 37 °C para quantificação visual do crescimento bacteriano após 24 e 48 horas. Na ausência de crescimento, as placas permaneceram incubadas pelo período total de 14 dias para uma nova leitura.

O protocolo da análise microbiológica da água é representado na tabela 7.

Tabela 7. Descrição do protocolo de análise microbiológica da água.

Grupos	Descrição do Protocolo	Tempo de coleta
Grupo 2	O ₃ +US (5 min.) + O ₃ (2 min.)	0, 5 e 7 min.
Grupo 3	O ₃ (5 min.)	0 e 5 min.
Grupo 4	US (5 min.)	0 e 5 min.

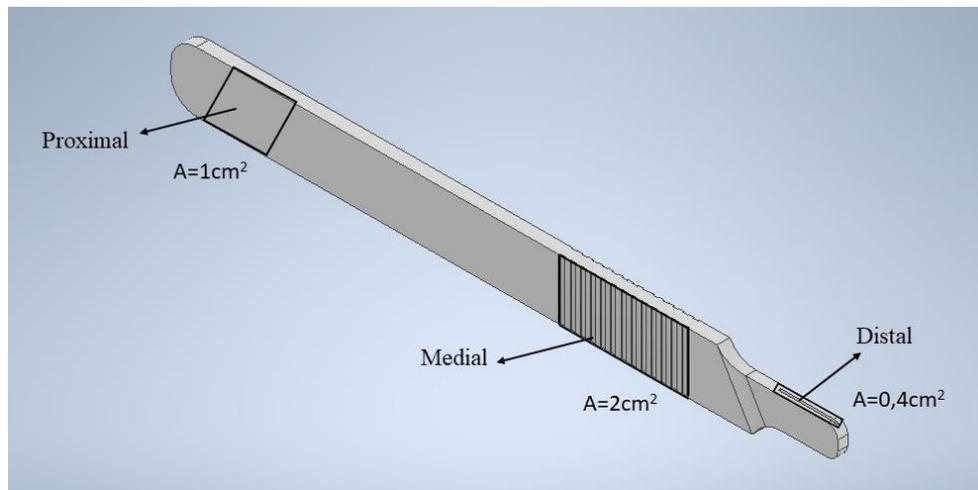
O₃+US = ozônio associado ao ultrassom; O₃ = ozônio; US = ultrassom. Fonte: Autor

4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DOS CABOS DE BISTURI

Para a análise microbiológica quantitativa da superfície do cabo de bisturi, amostras foram coletadas de suas duas faces, em três regiões: proximal (área total de 2 cm²), medial (área total de 4 cm²) e distal (área total de 0,8 cm²), conforme

demonstrado na Figura 8. Após os processos de desinfecção, os cabos foram retirados do reservatório principal e as amostras foram coletadas por meio de fricção com o *swab* estéril. Na sequência foi realizada a recuperação bacteriana do *swab* em água destilada e 100 μL dessa suspensão foi semeada em meio TSA pelo método de espalhamento em placa. As placas foram incubadas à 37 °C para quantificação visual do crescimento bacteriano após 24 e 48 horas. Na ausência de crescimento, as placas permaneceram incubadas pelo período total de 14 dias para uma nova leitura. Foram testados 15 cabos de bisturi em cada grupo experimental.

Figura 6. Indicação das regiões onde foram coletadas amostras da superfície do cabo de bisturi com o auxílio de um *swab* estéril.



Fonte: Autor.

4.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DIRETA DOS CABOS DE BISTURI

Para a análise microbiológica qualitativa, após os processos de desinfecção, os cabos de bisturi foram imersos em tubos estéreis contendo meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) para avaliar a presença de crescimento bacteriano. Neste meio de cultura, a turvação do meio após incubação indica a presença de crescimento bacteriano. Os tubos foram incubados à 37 °C para verificação da turbidez após 24 e 48 horas. Na ausência de crescimento bacteriano (turvação), os tubos permaneceram incubados pelo período total de 14 dias para uma nova verificação. Foram testados 15 cabos de bisturi para cada grupo experimental.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MEV-FEG

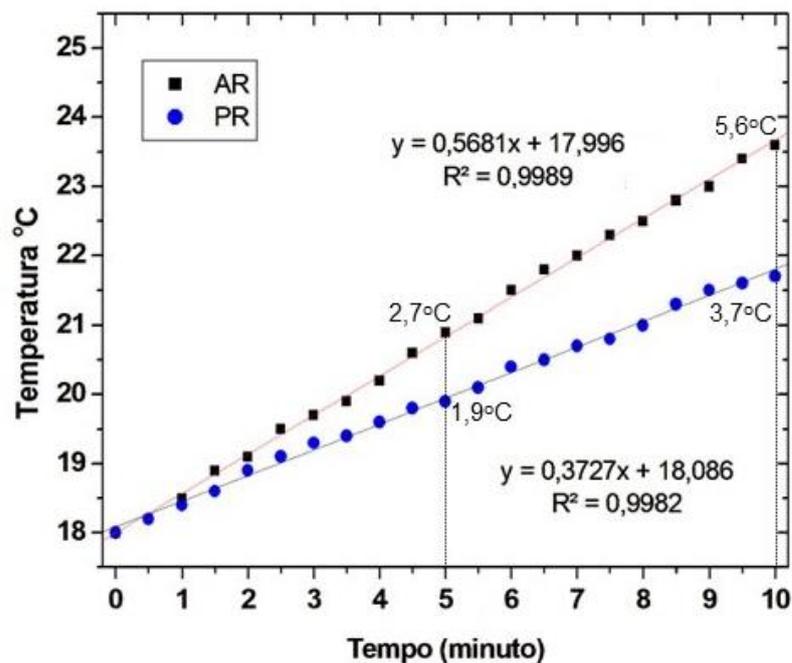
Amostras do cabo de bisturi que passaram por diferentes processos de desinfecção foram preparadas para análise em Microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG, Tescan, MIRA3). As amostras foram fixadas por imersão em uma solução contendo 25% de glutaraldeído em uma solução tamponada com fosfato 0,2 M e água destilada. Após a fixação, as amostras foram mantidas entre 2 e 8 °C por 24 horas, e então, lavadas 3 vezes por 30 minutos cada em uma solução com tampão fosfato 0,2 M e água destilada na proporção 1:1. Após a lavagem, foi realizada a desidratação, da seguinte forma: álcool 30 % por 10 minutos; álcool 50 % por 10 minutos; álcool 70 % por 10 minutos; álcool 90 % por 10 minutos; álcool 90 % por 20 minutos; álcool 100 % por 10 minutos e álcool 100 % por 20 minutos.

Após a desidratação, as amostras foram revestidas com uma película de ouro em metalizadora a plasma (Desk V, Denton Vacuum) a fim de se atingir a condutividade necessária para análise visual das imagens no MEV-FEG.

5 RESULTADOS

A temperatura da água foi monitorada durante o uso do ultrassom antes e após a refrigeração do sistema hidrodinâmico, ao longo de 10 minutos (Figura 7). Antes da refrigeração do sistema, observamos um aumento de temperatura de 2,7 °C (5 minutos) e 5,6 °C (10 minutos), enquanto após a refrigeração, o aumento foi de apenas 1,9 °C (5 minutos) e 3,7 °C (10 minutos). Baseado nesses dados, foi definido o tempo de associação da água ozonizada com o ultrassom em 5 minutos e a temperatura da água do sistema em 18 °C. Dessa forma, mesmo com o aquecimento, a água se manteria em torno de 20 °C.

Figura 7. Curva de temperatura da água ao longo do tempo antes e após a refrigeração do sistema hidrodinâmico.

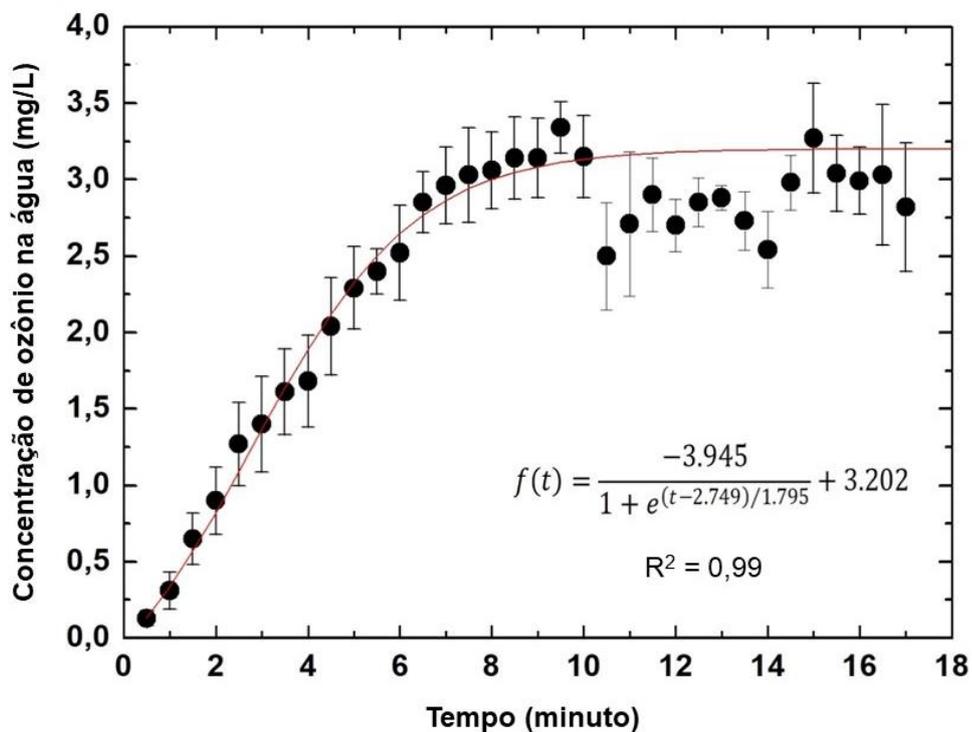


AR = antes da refrigeração, PR = pós refrigeração. Fonte: Autor

Foi determinada a curva de concentração de ozônio com a finalidade de se obter sua saturação na água (mg/L) em função do tempo de ozonização (Figura 8). Após 7 minutos de ozonização a concentração de ozônio dissolvido na água se manteve praticamente estável, sendo que a concentração máxima obtida foi de 3,34 mg/L após 9,5 minutos de ozonização. Com base nestas informações, foi definido que 10 minutos seria o tempo ideal para se obter a saturação da concentração de ozônio

dissolvido na água, e a partir daí, as amostras poderiam ser inseridas no sistema para serem desinfetadas. Com $R^2 = 0,99$ (coeficiente de determinação), os resultados demonstraram uma alta correlação. É possível verificar também que após a ativação do ultrassom e a adição dos cabos de bisturi contaminados houve uma redução na concentração de ozônio dissolvido na água de 3,15 mg/L para 2,50 mg/L.

Figura 8. Curva de concentração de ozônio dissolvido em água durante todo processo de desinfecção utilizando água ozonizada associada ao ultrassom (Grupo 2).



Fonte: Autor

5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

O resultado das análises microbiológicas da água é apresentado na Tabela 8. Em todos os processos avaliados, não foi detectado crescimento bacteriano da água antes da colocação dos cabos de bisturi para desinfecção (0 min.), indicando que o sistema hidrodinâmico não estava contaminado. Não foi detectado crescimento bacteriano na água durante o processo de desinfecção utilizando água ozonizada associada ao ultrassom (Grupo 2) e somente água ozonizada (Grupo 3). No entanto,

quando se empregou apenas o ultrassom (Grupo 4), a água apresentou crescimento bacteriano em todas as etapas analisadas.

Tabela 8. Determinação de crescimento bacteriano na água durante o protocolo dos grupos 2, 3 e 4 ao longo do tempo.

Tempo de Incubação	Tempo de Desinfecção						
	Grupo 2			Grupo 3		Grupo 4	
	0 min.	5 min.	7 min.	0 min.	5 min.	0 min.	5 min.
24 horas	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	P/C 15*
48 horas	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	--
14 dias	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	--

A/C = Ausência de crescimento bacteriano; PC = Presença de crescimento bacteriano

* representação do número total de amostras. Fonte: Autor

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DOS CABOS DE BISTURI

A Tabela 9 mostra a determinação do crescimento bacteriano da superfície dos cabos de bisturi contaminados experimentalmente (regiões proximal, média e distal) dos Grupos 1, 2 e 3. Não foi observado crescimento bacteriano nos cabos de bisturi que foram submetidos ao processo de desinfecção com água ozonizada associada ao ultrassom e somente água ozonizada, indicando que houve uma redução de 2-Log (região distal) e 3-Log (regiões média e proximal) na contagem bacteriana.

Em contrapartida, as amostras do grupo que foi submetido à desinfecção somente por ultrassom (Grupo 4) apresentaram crescimento bacteriano incontável em todas as regiões dos cabos de bisturi, indicando que o ultrassom sozinho não foi capaz de promover uma descontaminação eficiente.

Tabela 9. Determinação do crescimento bacteriano nas regiões proximal, média e distal dos cabos de bisturi dos grupos 1, 2 e 3

Amostras (região)	Tempo de incubação (UFC/mL)						
	24 horas	24 horas	48 horas	14 dias	24 horas	48 horas	14 dias
	Grupo 1		Grupo 2			Grupo 3	
proximal	8 x 10 ²	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*
média	9 x 10 ³	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*
distal	4 x 10 ³	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*	A/C 15*

A/C = Ausência de crescimento microbiano. * representação do número total de amostras. Fonte: Autor

5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DIRETA DOS CABOS DE BISTURI

A Tabela 10 mostra os dados da análise qualitativa em relação à presença ou ausência de crescimento bacteriano após os diferentes processos de desinfecção. O resultado demonstrou que não houve turvação do meio TSB nos grupos que foram submetidos à desinfecção com água ozonizada associada ao ultrassom (Grupo 2) e somente água ozonizada (Grupo 3), indicando a ausência de células bacterianas viáveis nos cabos de bisturi. A desinfecção se mostrou eficiente mesmo nas áreas de contato dos cabos de bisturi com os fios de nylon. O grupo submetido somente ao ultrassom (Grupo 4), apresentou turvação do meio TSB em todas as análises.

Tabela 10. Determinação do crescimento bacteriano (turvação do meio TSB) dos cabos de bisturi contaminados experimentalmente em meio TSB.

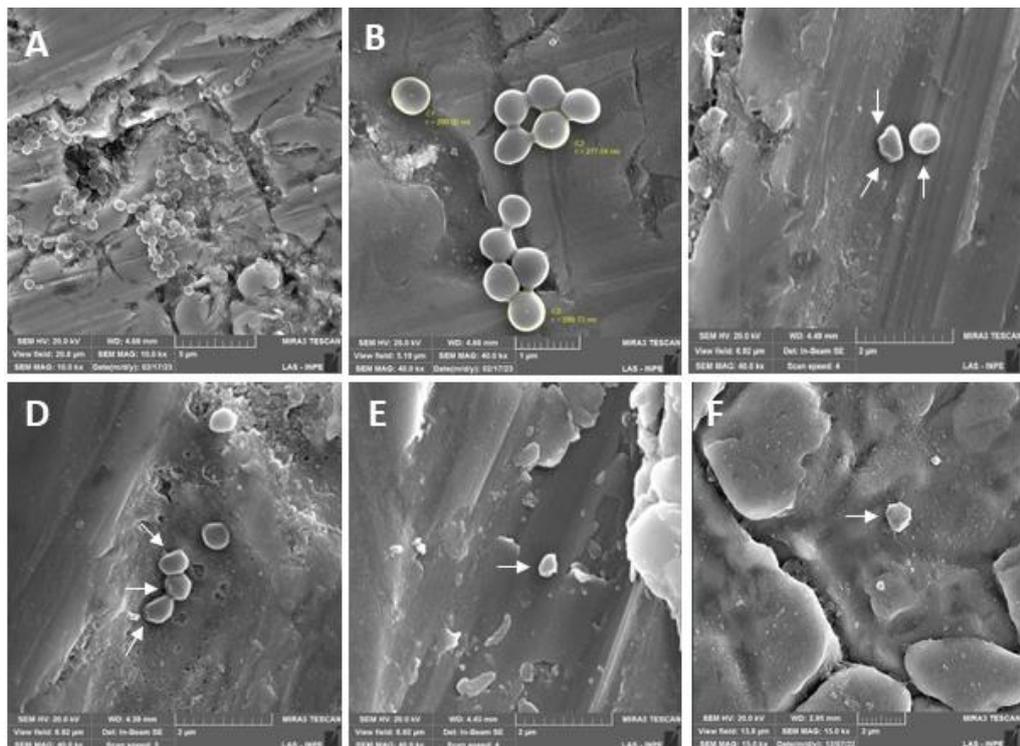
Amostras	24 horas	48 horas	14 dias
Grupo 2	Negativo	Negativo	Negativo
O ₃ US (5 min.) + O ₃ (2 min.)	(15/15)	(15/15)	(15/15)
Grupo 3	Negativo	Negativo	Negativo
O ₃ (5 min.)	(15/15)	(15/15)	(15/15)
Grupo 4	Positivo	---	---
US (5 min.)	(15/15)	---	---

Positivo = número de amostras com crescimento bacteriano; Negativo = número de amostras sem crescimento bacteriano/total de 15 amostras. Fonte: Autor

5.4 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA OZONIZAÇÃO E ULTRASSOM NA SUPERFÍCIE BACTERIANA UTILIZANDO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV-FEG)

A Figura 9 apresenta as imagens das amostras biológicas obtidas por MEV-FEG após a ozonização e sonicação isoladamente, com o intuito de verificar as alterações induzidas na superfície das bactérias. Nas amostras *in natura* de *S. aureus* foi possível observar as bactérias na sua forma de cocos, apresentando morfologia característica e superfície uniforme (9A,9B). Após 3 e 5 minutos de exposição somente ao ozônio foi possível observar danos (lesões) na superfície da parede celular das bactérias, observou-se também uma transformação da geometria se apresentando uma forma irregular (9C,9D). Após a exposição das amostras somente ao ultrassom, durante 5 e 10 minutos, também foi possível observar danos na superfície da parede celular das bactérias (9E,9F). As setas indicam os danos causados nas bactérias.

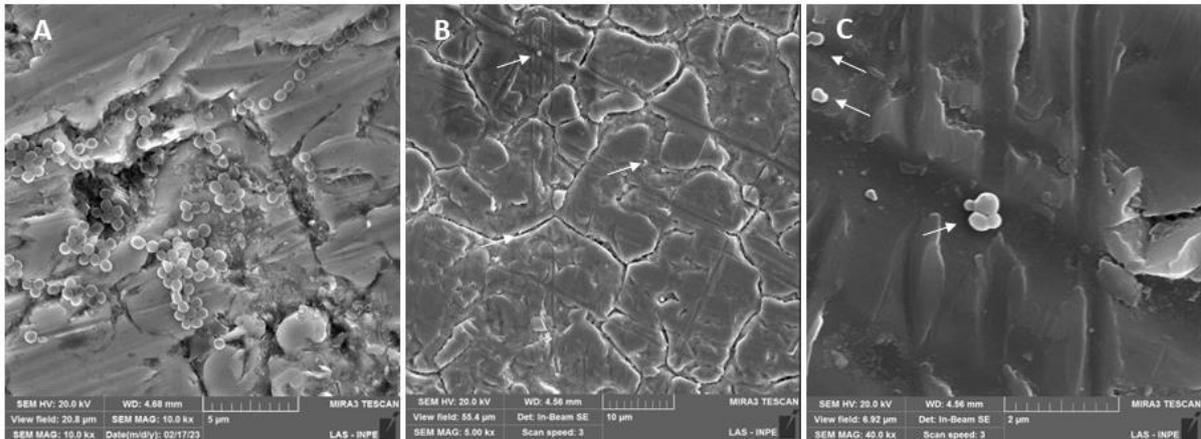
Figura 9. Imagens das amostras biológicas obtidas por MEV. (9A, 9B) controle positivo, (9C) amostra submetida ao ozônio por 3 minutos, (9D) amostra submetida ao ozônio por 5 minutos, (E) amostra submetida ao ultrassom por 5 minutos, (9F) amostra submetida ao ultrassom por 10 minutos.



Fonte: Autor.

Na Figura 10A é apresentada uma imagem de amostras que não foram submetidas ao processo de desinfecção, é bem visível a quantidade de bactérias presentes na superfície. Cabe destacar que a superfície metálica é bem irregular apresentando cavidades de alojamento dos microrganismos, o que favorece a adesão das bactérias e dificulta a sua remoção. Na figura 10B as amostras do Grupo 2 apresentaram uma redução nítida do número de bactérias presentes, as setas indicam o resíduo de bactérias que ficaram na superfície da amostra. A figura 10C representa a imagem anterior ampliada, evidenciando que as bactérias remanescentes após a desinfecção apresentaram morfologia alterada, sugerindo que não estão mais viáveis, uma vez que nas análises microbiológicas não houve crescimento bacteriano.

Figura 10. Imagens das amostras biológicas obtidas por MEV-FEG. (12A) controle positivo; (12B) amostra submetida ao protocolo do grupo 2, as setas indicam o resíduo de bactérias presente. (12C) imagem ampliada da amostra submetida protocolo do grupo 2, as setas indicam as bactérias com morfologia alterada.



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema hidrodinâmico que pudesse se beneficiar do efeito sinérgico da corrente de água formada pelo circuito sinuoso, da ação oxidativa do ozônio e da propagação de ondas acústicas e cavitação geradas pelo ultrassom para promover a desinfecção de materiais cirúrgicos.

O reservatório principal foi construído com uma geometria sinuosa para que se formasse uma corrente de água, auxiliando na remoção das bactérias da superfície dos cabos de bisturi. Foi decidido utilizar água ozonizada ao invés de gás ozônio, pois estudos demonstram que o ozônio mantém seu poder oxidante por mais tempo em meio aquoso, além de possuir baixa toxicidade, sendo mais seguro (AGOSTINI et al., 2021). Para a incorporação de ozônio na água, foi escolhido utilizar um injetor Venturi ao invés de um difusor, pois ele torna o processo de transferência de ozônio na água mais eficiente (CARVALHO et al., 2015).

O cabeçote de ultrassom com cristal piezoelétrico fixado abaixo do reservatório principal, emite altas intensidades de ondas acústicas no meio líquido, gerando também o efeito de cavitação, onde ocorre a implosão de bolhas, resultando no local altas pressões e temperaturas (PASSOS et al., 2014). A atividade vibracional do cristal gera aumento de temperatura no transdutor, que associado à cavitação, promoveu um aumento de cerca de 2,7 °C na água, em 5 minutos. Para evitar a degradação do ozônio pelo aumento da temperatura, foi instalado um sistema de refrigeração, com duas ventoinhas, uma de cada lado do cabeçote de ultrassom e um sistema de refrigeração utilizando placa Peltier, que foi capaz de diminuir esse aumento de temperatura para 1,9 °C, em 5 minutos. Para a desinfecção foi decidido utilizar água deionizada estéril à 18 °C, pois mesmo com a mudança de temperatura gerada pelo ultrassom, a água ainda permaneceu em torno de 20 °C, temperatura que o ozônio possui meia-vida de 40 minutos, que significa a diminuição de sua concentração pela metade durante esse tempo (BOCCI, 2011).

Foram colocados no fundo do reservatório principal dois fios de nylon (0,3 mm) para que os cabos de bisturi pudessem ser apoiados com o mínimo contato possível de área. Embora o contato de área seja mínimo, ainda sim poderia ser um local que possibilitasse a permanência das bactérias, porém a condição hidrodinâmica do

sistema com a propagação das ondas acústicas e a cavitação se mostraram eficientes na remoção das bactérias mesmo nessas áreas de contato.

Dentre os instrumentos cirúrgicos foram selecionados cabos de bisturi, pois, são instrumentos que se aproximam da incisão cirúrgica e possuem alto risco de contaminação. Eles foram previamente esterilizados e depois contaminados experimentalmente com *S. aureus*, uma vez que ela possui grande capacidade de formação de biofilmes em materiais cirúrgicos e é a causa mais comum de infecções do sítio cirúrgico (KARA TERKI et al., 2020; KOLASIŃSKI, 2018). Para este estudo, após a contaminação dos cabos de bisturi, eles não foram submetidos a nenhuma limpeza manual, justamente para que o sistema hidrodinâmico pudesse ser submetido à uma condição extrema de contaminação.

Estudos que utilizaram o ultrassom para desinfecção demonstraram que ele demanda muito tempo de atuação para ter uma ação microbida expressiva. Passos et al. (2014), comparou o efeito do ultrassom e do ozônio na eliminação de cistos *Giardia ssp* de águas residuais e demonstrou que ele foi capaz de promover uma redução microbiana significativa (80 %) somente com 240 minutos de tratamento. Fonseca et al. (2015) também comparou o efeito do ultrassom e do ozônio na eliminação de *Streptococcus mutans* em instrumentos odontológicos e obteve 2-log de redução de microbiana (99,2 %) com 25 minutos de exposição somente ao ultrassom. No presente estudo foi realizado um protocolo de desinfecção com ultrassom por 10 minutos e o resultado das análises microbiológicas confirmaram que este tempo não foi suficiente para se obter um efeito microbida.

Apesar do ultrassom não ter induzido uma redução do crescimento microbiano em 10 minutos, ele foi utilizado nesse trabalho pela sua capacidade de remover os microrganismos e resíduos de superfícies através da propagação das ondas acústicas e da cavitação (FETYAN; SALEM ATTIA, 2020). Fonseca et al. (2015) demonstraram a sinergia entre ozônio e ultrassom, que quando combinados, aumenta o poder de inativação de microrganismos. Os estudos que combinam US e ozônio utilizaram sistemas de desinfecção estático, neste sentido, no presente estudo foi desenvolvido um sistema hidrodinâmico inovador.

Diversos estudos demonstraram o potencial da água ozonizada como agente microbida (AGOSTINI et al., 2021; AWOYAMA et al., 2023; CARVALHO et al., 2023; MARSON et al., 2016; MOREIRA FONSECA et al., 2015, 2019, 2021; PASSOS et al., 2014). Ao avaliar o efeito do sistema hidrodinâmico com água ozonizada sem o

ultrassom, foi constatado que com 5 minutos houve uma desinfecção eficiente dos cabos de bisturi, porém a imagem por MEV-FEG demonstrou que as bactérias, mesmo inativas, ainda permaneciam em grande quantidade na superfície dos cabos de bisturi. Esse resultado enfatizou a necessidade da associação do ultrassom para uma remoção mais eficiente das bactérias e de resíduos orgânicos aderidos na superfície.

O protocolo de desinfecção foi monitorado e de acordo com a curva de concentração de ozônio dissolvido em água, foi obtida uma concentração máxima de 3,34 mg/L durante o período de 10 minutos de ozonização prévia. Após esse período, o ultrassom foi ativado e o material contaminado foi colocado no sistema, iniciando-se o processo de desinfecção. Nesse momento, houve uma queda da concentração de ozônio de 3,15 mg/l para 2,50 mg/L, que depois continuou oscilando até o final do processo. Esse fato provavelmente ocorreu pela dissociação do ozônio devido ao início do processo de propagação das ondas acústicas e cavitação, associado ao consumo do ozônio durante o processo de oxidação das bactérias presentes, informação também relatada em outros trabalhos (LIU et al., 2019; WU et al., 2020).

Awoyama et al. (2022) utilizou um sistema hidrodinâmico com água ozonizada para a desinfecção de membrana amniótica humana com uma dosagem de ozônio aplicada de 3,9 mg/cm², obtendo após 10 minutos, uma redução de contagem microbiana de 2-log. O sistema desenvolvido no presente estudo operou com uma dosagem de ozônio aplicada de 3,0 mg/cm² e em 7 minutos houve uma redução de contagem microbiana na superfície dos cabos de bisturi de 2-log (região distal) e 3-Log (regiões média e proximal). A análise microbiológica da água durante o protocolo de desinfecção também não apresentou crescimento microbiano, confirmando que o tempo estabelecido de ozonização prévia e a concentração de ozônio utilizada foram suficientes para eliminar as bactérias do meio aquoso.

Lipscomb et al. (2006) em seu estudo relatou que a capacidade da técnica de coletar amostras eficazes por fricção com *swab* varia significativamente. Neste sentido, foi definido avaliar também a contaminação dos cabos de bisturi baseado na observação de turbidez devido ao crescimento de microrganismos em meio de cultura líquido (MARSON et al., 2016). Neste teste, os cabos de bisturi foram totalmente submersos em meio de cultura TSB estéril e não foi observada turvação dos meios após 14 dias.

As amostras foram submetidas a análise por MEV-FEG para verificar possíveis alterações nas bactérias e avaliar o poder de remoção do biofilme formado na superfície dos cabos de bisturi. Foi verificado que a partir de 3 minutos em contato com o ozônio, as bactérias já começaram a sofrer danos, apresentando lesões na superfície celular, provavelmente decorrente da oxidação de seus componentes celulares. Nas amostras que tiveram contato somente com o ultrassom, também foram observadas rupturas na superfície celular, alterando toda a sua morfologia, que pode ser explicado pela ação da cavitação e propagação das ondas acústicas. Estes dados corroboram com os obtidos por Fonseca et al. (2020) que avaliaram a bactéria *Streptococcus mutans*, considerada um dos agentes etiológicos da cárie humana.

O MEV-FEG também foi empregado para verificar o grau de contaminação da superfície das amostras analisadas. As imagens demonstraram que 7 minutos de desinfecção foram suficientes para remover praticamente todo o biofilme formado. Algumas bactérias foram encontradas durante a captação das imagens, porém, como confirmado pela análise microbiológica, se encontravam inativas.

Baseado em todas essas informações, este sistema inovador se mostrou eficiente para a remoção de biofilme da superfície dos instrumentos, bem como para a desinfecção, apresentando um grande potencial de esterilização. A condição hidrodinâmica do sistema associada à propagação das ondas acústicas e a cavitação produzidas pelo ultrassom promoveram uma remoção das bactérias da superfície dos cabos de bisturi (aço inox) enquanto a água corrente ozonizada favoreceu a diluição da matéria orgânica no líquido, não permitindo sua sedimentação. Dessa forma, o ozônio dissolvido na água foi capaz de desempenhar seu papel microbicida de forma eficiente, oxidando a matéria orgânica presente.

O sistema utilizado nesse estudo foi capaz de promover uma desinfecção eficiente em pouco tempo e o uso da água ozonizada apresentou a vantagem de ser seguro, uma vez que o ozônio se decompõe em oxigênio e não gera resíduos tóxicos. A água ozonizada é inclusive autorizada a ser utilizada para consumo humano pelo Ministério da Saúde, Trabalho e Previdência no Japão, demonstrando seu alto nível de segurança, mostrando sua propriedade atóxica (HAYAKUMO et al., 2013). Além dessas vantagens, esse sistema não necessita de aditivos químicos, podendo inclusive ser utilizado para a desinfecção de para materiais termo sensíveis.

Devido ao potencial de esterilização, estudos futuros verificariam este efeito e, a partir disso, seria possível desenvolver um equipamento com capacidade de

esterilização. O reservatório principal deste equipamento teria uma embalagem semiaberta e, após o processo de desinfecção, a água seria drenada, haveria a secagem do material com vácuo e radiação infravermelha, injeção de gás ozônio e então a selagem automatizada da embalagem, garantindo assim um armazenamento residual de ozônio a fim de garantir a esterilização.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o sistema hidrodinâmico desenvolvido mostrou-se eficiente para a desinfecção de cabos de bisturi contaminados experimentalmente. Ele é inovador por se beneficiar da sinergia do fluxo de corrente de água associada ao poder de remoção de biofilme do ultrassom e a ação oxidante do ozônio. Neste sentido, foi capaz de promover a desinfecção dos cabos de bisturi empregando-se uma concentração mínima de ozônio dissolvido em água de 2,50 mg/L, em 7 minutos.

É um sistema seguro, não gera resíduos químicos e não necessita de aditivos químicos, podendo inclusive ser utilizado para materiais termo sensíveis. Os resultados demonstraram que o sistema hidrodinâmico é eficiente para a desinfecção de instrumentos cirúrgicos com um potencial de esterilização, sendo necessários estudos futuros para verificar este efeito.

REFERÊNCIAS

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2004.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **RDC nº 35, de 16 de Agosto de 2010**. Dispõe Sobre o Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana Utilizados em Artigos Críticos e Semicríticos, 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sítio Cirúrgico: Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde**, 2017.

AGOSTINI, F. *et al.* In Vitro Comparison of Antibacterial Effect of Ozonated Water and Ozonated Gas. **Ozone: Science and Engineering**, v. 43, n. 4, p. 394–400, 2021.

AL-ALI, K. *et al.* Antibacterial Activity of Four Herbal Extracts Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients in Almadinah Hospital, Saudi Arabia. **IJSR International Journal of Academic Scientific Research**, v. 2, n. 2, p. 27–34, 2014.

ANDERSON, M. J. *et al.* Efficacy of Skin and Nasal Povidone-iodine Preparation Against Mupirocin-resistant Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *S. aureus* within the Anterior Nares. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2765–2773, 2015.

AWOYAMA, S. M. *et al.* Disinfection of Human Amniotic Membrane Using a Hydrodynamic System with Ozonated Water. **Ozone: Science and Engineering**, v. 45, n. 1, p. 28–40, 2023.

BADIA, J. M. *et al.* Impact of Surgical Site Infection on Healthcare Costs and Patient Outcomes: A Systematic Review in Six European Countries. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 1, p. 1-15, 2017.

BOCCI, Velio. **Ozone. A New Medical Drug**. 2nd Edition. New York: Springer, 2011

CARVALHO, H. C. *et al.* Effectiveness of ozone-liquid mass transfer aiming ozone therapy. *In: World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, 2015, Toronto. Resumos. Toronto: Springer International Publishing, 2015, p. 1823-1825

CARVALHO, M. C. O. *et al.* Preliminary Study: Disinfection of Colonoscope Using a Reprocessing System Based on a Hydrodynamic Model with Ozonated Water. **Ozone: Science and Engineering**, v. 45, n. 3, p. 1-12, 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Staphylococcus aureus* in Healthcare Settings. **US Department of Health & Human Services**, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. A Rational Approach to Disinfection and Sterilization. **US Department of Health & Human Services**, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. **US Department of Health & Human Services**, 2023.

DA SILVA, S. B. *et al.* Potencialidades do Uso do Ozônio no Processamento de Alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p.659-682, 2011.

DE CARVALHO, R. L. R. *et al.* Incidence and risk factors for surgical site infection in general surgeries. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 25, p. 1-8, 2017.

DE OLIVEIRA, C. R. *et al.* Ozonated Water in Disinfection of Hospital Instrument Table. **Research on Biomedical Engineering**, p. 1-6, 2023.

EBSERH – Hospitais Universitários Federais. **Protocolo PRO/SVSSP.SCIRAS/P0004/2019 Prevenção de Infecção do Sítio Cirúrgico**, 2019.

FETYAN, N. A. H.; SALEM ATTIA, T. M. Water Purification Using Ultrasound Waves: Application and Challenges. **Arab Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 27, n.1, p. 194-207, 2020.

FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, Invasion and Evasion: The Many Functions of the Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

GOGATE, P. R. Application of Cavitation Reactors for Water Disinfection: Current Status and Path Forward. **Journal of Environmental Management**, v. 85, n. 4, p. 801-815, 2007.

HAYAKUMO, S. *et al.* Clinical and Microbiological Effects of Ozone Nano-bubble Water Irrigation as an Adjunct to Mechanical Subgingival Debridement in Periodontitis Patients in a Randomized Controlled Trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 2, p. 379–388, 2013.

HERVÉ, R.; SECKER, T. J.; KEEVIL, C. W. Current Risk of Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK: Efficacy of Available Cleaning Chemistries and Reusability of Neurosurgical Instruments. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 4, p. 309–313, 2010.

KARA TERKI, I. *et al.* Effects of Certain Disinfectants and Antibiotics on Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Medical Devices at the University Hospital Center of Sidi Bel Abbes, Algeria. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 304–310, 2020.

KOLASIŃSKI, W. Surgical site infections - Review of Current Knowledge, Methods of Prevention. **Polish Journal of Surgery**, v. 90, n. 5, p. 1–7, 2018.

LIPSCOMB, I. P. Rapid Method for the Sensitive Detection of Protein Contamination on Surgical Instruments. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, n.2, p. 141-148, 2006.

LIU, C. *et al.* Ultrasound-enhanced Catalytic Ozonation Oxidation of Ammonia in Aqueous Solution. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 12, 2019.

LOPES, L. K. O. *et al.* Complex Design of Surgical Instruments as Barrier for Cleaning Effectiveness, Favouring Biofilm Formation. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 1, p. 53-60, 2019.

LOPES, M. S. *et al.* Disinfection of Corrugated Tubing by Ozone and Ultrasound in Mechanically Ventilated Tracheostomized Patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 90, n. 4, p. 304-309, 2015.

MARSON, R. F. *et al.* Use of Ozonated Water for Disinfecting Gastrointestinal Endoscopes. **Ozone: Science and Engineering**, v. 38, n. 5, p. 346–351, 2016.

MASON, T. J. *et al.* Potential Uses of Ultrasound in the Biological Decontamination of Water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 6, p. 319-323, 2003.

MEGAHED, A.; ALDRIDGE, B.; LOWE, J. The Microbial Killing Capacity of Aqueous and Gaseous Ozone on Different Surfaces Contaminated with Dairy Cattle Manure. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. 1-22, 2018.

MOREIRA FONSECA, P. M. *et al.* Disinfection of Dental Instruments Contaminated with *Streptococcus mutans* Using Ozonated Water Alone or Combined with Ultrasound. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 1, p. 85–89, 2015.

MOREIRA FONSECA, P. M. *et al.* Analysis of Damage on the *Streptococcus mutans* Immersed in Ozonated Water: Preliminary Study for Application as Mouth Rinse. **Ozone: Science and Engineering**, v. 41, n. 3, p. 242–249, 2019.

MOREIRA FONSECA, P. M. *et al.* Preliminary Study: Comparative Analysis of the Effects of Ozone and Ultrasound on *Streptococcus Mutans*. **Ozone: Science and Engineering**, v. 43, n. 3, p. 263–275, 2021.

MUSCAT, Y. *et al.* Investigation of Acrylic Resin Disinfection Using Chemicals and Ultrasound. **Journal of Prosthodontics**, v. 27, n. 5, p. 461–468, 2018.

OGSTON, A. On Abscesses. **Reviews Of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 122-128, 1984.

LYELL ALAN. Alexander Ogston, Micrococci, and Joseph Lister. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 302–310, 1989.

PASSOS, T. M. *et al.* Comparative Analysis of Ozone and Ultrasound Effect on the Elimination of *Giardia spp.* Cysts from Wastewater. **Ozone: Science and Engineering**, v. 36, n. 2, p. 138–143, 2014.

RESENDIZ, M. *et al.* Assessment of Surgical Instrument Bioburden after Steam Sterilization: A pilot study. **American Journal of Infection Control**, v. 48, n. 2, p. 219–221, 2020.

RUBIN, M. B. The History of Ozone. The Schönbein Period, 1839-1868. **Bull. Hist. Chem.**, v. 26, n. 1, p. 40–56, 2001.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities: What Clinicians Need to Know. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 5, p. 702–709, 2004.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection, Sterilization, and Antisepsis: An Overview. **American Journal of Infection Control**, v. 47, p. 3-9, 2019.

SARRON, E.; GADONNA-WIDEHEM, P.; AUSSENAC, T. Ozone treatments for preserving fresh vegetables quality: A critical review. **Foods**. V. 10, n.3, p.1-39, 2021.

SAVAGE, J. W.; ANDERSON, P. A. An Update on Modifiable Factors to Reduce the Risk of Surgical Site Infections. **The Spine Journal**, v. 13, n. 9, p. 1017-1029, 2013.

SECKER, T. J. *et al.* A Cold Water, Ultrasonically Activated Stream Efficiently Removes Proteins and Prion-associated Amyloid from Surgical Stainless Steel. **Journal of Hospital Infection**, v. 106, n. 4, p. 649–656, 2020.

SMITH, K. *et al.* Is Retained Bone Debris in Cannulated Orthopedic Instruments Sterile After Autoclaving? **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 9, p. 1009–1013, 2018.

TABA, V. L. *et al.* Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Surgical Needles by Exposure to Ozone Gas and Low Pressure. **Ozone: Science and Engineering**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2022.

TURNER, N. A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An Overview of Basic and Clinical Research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019.

VAN LEEUWEN, J. Proposed OS&E Requirement: Measuring Ozone Dosage. **Ozone: Science and Engineering**, v. 37, n. 2, p. 191-192, 2015.

VYAS, N. *et al.* Which Parameters Affect Biofilm Removal with Acoustic Cavitation? A Review. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 45, n. 5, p. 1044-1055, 2019.

WANG, G. *et al.* High-quality 3D Structures Shine Light on Antibacterial, Anti-biofilm and Antiviral Activities of Human Cathelicidin LL-37 and its Fragments. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1838, n. 9, p. 2160-2172, 2014.

WU, Z. *et al.* Removal of Blue-green Algae Using the Hybrid Method of Hydrodynamic Cavitation and Ozonation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 235, p. 152–158, 2012.

WU, Z. *et al.* Decomposition of Chloroform and Succinic Acid by Ozonation in a Suction-cavitation System: Effects of Gas Flow. **Separation and Purification Technology**, v. 161, p. 25–31, 2016.

WU, Z. *et al.* Sonozonation (sonication/ozonation) for the Degradation of Organic Contaminants – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 68, p. 1-12, 2020.