

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

*Ana Paula Gonçalves Pita*

Esterilização de fresas *carbide* em fornos de micro-ondas domésticos. Efeito da capacidade, da potência, do meio de imersão, da quantidade e posição da amostra sobre o tempo de exposição

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Prótese

Orientador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva

Araraquara  
2009

Pita, Ana Paula Gonçalves

Esterilização de fresas *carbide* em fornos de micro-ondas domésticos. Efeito da capacidade, da potência, do meio de imersão, da quantidade e posição da amostra sobre o tempo de exposição / Ana Paula Gonçalves Pita. – Araraquara: [s.n.], 2009.

84 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Helena Barbosa  
Tavares da Silva

1. Esterilização 2. Instrumentos odontológicos 3.  
Infecção - Transmissão I. Título

ANA PAULA GONÇALVES PITA

ESTERILIZAÇÃO DE FRESAS *CARBIDE* EM FORNOS DE MICRO-ONDAS DOMÉSTICOS. EFEITO DA CAPACIDADE, DA POTÊNCIA, DO MEIO DE IMERSÃO, DA QUANTIDADE E POSIÇÃO DA AMOSTRA SOBRE O TEMPO DE EXPOSIÇÃO

COMISSÃO JULGADORA  
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo  
Professor Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Antunes Pereira Pinelli  
Professora Assistente Doutora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP

3º Examinador: Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz  
Professor Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP

4º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taís Maria Bauab  
Professor Assistente Doutor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

5º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Magnani Bevilacqua  
Professora Titular da Universidade Paulista.

Araraquara, 14 de julho de 2009

## Dados Curriculares

Ana Paula Gonçalves Pita

NASCIMENTO 26 de dezembro de 1979 – Botucatu – SP

FILIAÇÃO Humberto José Pita  
Vânia Helena Gonçalves Pita

1998/2001 Curso de Graduação  
Faculdade de Odontologia  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

2003/2004 Curso de Pós-Graduação em  
Reabilitação Oral – Área Prótese, Nível  
de Mestrado, na Faculdade de  
Odontologia de Araraquara – UNESP

2005/2009 Curso de Pós-Graduação em  
Reabilitação Oral – Área Prótese, Nível  
de Doutorado, na Faculdade de  
Odontologia de Araraquara - UNESP

## Dedicatória

À minha amada filha **Gabriela**,  
que desde “sementinha”, e mesmo sem ter consciência disso, participou e colaborou com cada uma das etapas deste trabalho. Aguardando a hora certa para chegar, e depois “curtindo” as 11 horas seguidas na escola, essa pequena princesinha foi fundamental para que eu conseguisse completar mais esse ciclo da minha vida.

À minha querida professora, orientadora e amiga  
**Regina Helena Barbosa Tavares da Silva**,  
grande responsável pela minha formação acadêmica. Em retribuição a todo apoio e orientação competente, deixo a você, e para sempre, esse trabalho, que nada mais é do que um fruto seu.

## Agradecimentos Especiais

Ao professor e orientador **Gelson Luis Adabo**, por possibilitar a manutenção da minha linha de pesquisa, reafirmando suas grandes virtudes de seriedade e respeito com a pesquisa. Obrigada pela orientação competente e confiante.

À minha querida professora, orientadora e amiga **Regina Helena Barbosa Tavares da Silva**, pela orientação competente, pelo apoio, incentivo e confiança depositados em mim. Nossa inesquecível cumplicidade será lembrada para sempre. Muito obrigada por tudo e sempre.

À professora **Taís Maria Bauab**, e toda a equipe de funcionários do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP pela acolhida e apoio competente.

Às estagiárias e amigas **Oriana Elara Barelli**, **Sandra Gouveia Spinolla**, **Camila Andrade Zamperini**, **Ana Paula Dias Ribeiro** e **Laiza Maria Grassi Fais**, que colaboraram ativamente na execução deste trabalho. Serei sempre grata.

Ao **Murilo**, meu grande amor, eu agradeço paciência, o incentivo e o carinho dispensados a mim durante a etapa de conclusão deste trabalho.

À minha querida família, pelo apoio incondicional. Obrigada pela confiança e amor.

## Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, representada pelo Senhor Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Reabilitação Oral, área de Prótese, da Faculdade e Odontologia de Araraquara, pela contribuição em minha formação profissional.

A todos os professores do Departamento de Materiais Odontológicos Prótese pelos conhecimentos transmitidos com muita dedicação e competência.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, que me ajudaram, apoiaram e participaram desta fase de minha vida, em especial.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro concedido e indispensável à realização desta pesquisa.

A todos que, embora não estejam aqui citados, tenham contribuído para o desenvolvimento deste trabalho.

Minha eterna gratidão

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*



## Sumário

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>Resumo.....</b>                | <b>9</b>  |
| <b>Abstract.....</b>              | <b>12</b> |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>            | <b>15</b> |
| <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b> | <b>19</b> |
| <b>PROPOSIÇÃO.....</b>            | <b>41</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>     | <b>43</b> |
| <b>RESULTADO .....</b>            | <b>52</b> |
| <b>DISCUSSÃO.....</b>             | <b>65</b> |
| <b>CONCLUSÃO.....</b>             | <b>76</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>           | <b>78</b> |

Resumo

Pita APG. Esterilização de fresas *carbide* em fornos de micro-ondas domésticos. Efeito da capacidade, da potência, do meio de imersão, da quantidade e posição da amostra sobre o tempo de exposição. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

## RESUMO

O uso do forno de micro-ondas para a esterilização tem sido proposto em diferentes áreas. O tempo da exposição necessário para esterilizar água deionizada contaminada em diferentes posições dentro do forno foi avaliado e um método da esterilização de fresas *carbide* foi avaliado, considerando sua imersão ou não em 2 ml e 10 ml de água ou o óleo, a capacidade do forno (27 e 38 l), o nível de potência (400 e 600 W) e diferentes quantidades de instrumentos irradiados ao mesmo tempo (1, 5 e 10 fresas). Este trabalho foi feito em três etapas consecutivamente. Primeiramente, 10 ml da água deionizada foi contaminada por um dos três micro-organismos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*). A amostra contaminada foi situada em uma das 15 posições determinadas pela combinação das posições horizontais (anterior, posterior, direita, esquerda e central) e das posições verticais (sobre o prato giratório, 3 cm ou 5 cm acima do prato giratório) e foi submetida à irradiação por microondas (580 W) por 0,5, 1, 2, 5, 6, 7 ou 8 minutos. Nas etapas subseqüentes, as fresas estéreis foram contaminadas individualmente pelos mesmos micro-organismos. Após a contaminação, foram individualmente submetidas à irradiação (580 W) por 1, 2, 3, 4, 8, 9, 16, 17 ou 20 min em um frasco vazio ou contendo 2 ou 10 ml de água ou de óleo mineral. Na última etapa, os instrumentos contaminados foram irradiados individualmente ou nos grupos (5 ou 10 fresas), a aproximadamente 400 ou 600 W, em um dos dois fornos (27 ou 38 l) durante: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9,5; 10; 11; 13 ou 14,5 minutos. Após a irradiação foram adicionados 10 ml de meio fluido no frasco contendo os espécimes irradiados, que foram incubados a 37°C durante 48 h (*B.*

*subtilis* e *E. coli*) ou a 28°C durante 72 h (*C. albicans*) para avaliação do efeito da esterilização pela turvação do caldo. Após a análise dos resultados, pôde-se verificar que a posição da amostra deve ser considerada em métodos de esterilização utilizando-se fornos de microondas domésticos, sendo que a posição central deve ser evitada. A presença de um líquido de imersão em contato com a fresa é essencial para a esterilização, sendo que a água é superior ao óleo, proporcionado a esterilização com menor tempo de exposição do que o óleo. A potência e a quantidade de instrumentos influenciam no tempo de exposição, pois quanto mais elevado o nível de potência menor o tempo de exposição necessário, porém, quanto mais instrumentos irradiados simultaneamente, maior o tempo de exposição. A capacidade do forno não influenciou os resultados de esterilização. Para a esterilização de até 10 fresas *carbide* ao mesmo tempo é necessária sua imersão em 10 ml de água deionizada estéril e o acionamento do forno de microondas doméstico a aproximadamente 600 W durante 14,5 min.

Palavras-chave: Esterilização; instrumentos odontológicos; infecção – transmissão.

**Abstract**

Pita APG. Sterilization of carbide burs in domestic microwaves ovens: Effect of the oven capacity, the power level, the immersion liquid, the amount and the sample position over the exposition time. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

## ABSTRACT

The use of microwave oven for sterilization has been proposed in different fields. The exposition time required to sterilize contaminated deionized water in different positions was evaluated and a microwave sterilization method of dental carbide burs was tested considering their immersion or not in 2 ml or 10 ml of water or oil, the oven capacities (27 l and 38 l), the level power (400 and 600 W) and different amount of instruments irradiated at the same time (1, 5 and 10 burs). This work was done in three stages consecutively. First, 10 ml of deionized water were inoculated with three microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). The contaminated sample was located at one of the 15 positions determined by the combination of horizontal positions (anterior, posterior, right, left, centre) and vertical positions (on the glass plate, 3 cm over the glass plate level, 5 cm over the glass plate level) and microwaved (580 W) for 0.3, 1, 2, 5, 6, 7 or 8 minutes. In the subsequent stages, sterile burs were individually inoculated with the same microorganisms. The contaminated burs were microwaved at 580 W for 1, 2, 3, 4, 8, 9, 16, 17 or 20 min in the dry state or immersed in 2 or 10 ml of water or mineral oil. In last stage, the contaminated instruments were microwaved individually or in groups (5 or 10 burs), at approximately 400 or 600 W, into the two ovens for: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9,5;10; 11; 13 or 14,5 minutes. After irradiation sterile broth was added into the flask containing irradiated specimens and incubated at 37°C for 48h (*B. subtilis* and *E. coli*) or at 28°C for 72h (*C. albicans*), the sterilization effect was verified by the turbidity test. This study suggests that the position of the sample must be considered in domestic microwaves ovens sterilization methods and the central position should be avoided. The presence of a liquid material in

contact with the bur is essential to the lethal effect of microwaves and the water is superior to oil. The power level and the amount of instruments influence the time required to sterilization, but the oven capacity didn't. The application of this method with a maximum exposition time of 14.5 minutes at approximately 600 W guarantee the sterilization until 10 burs at the same time immersed in 10 ml of water.

Keywords: Sterilization; dental instruments; infection transmission.

## Introdução



## Introdução

A energia de micro-ondas tem sido extensamente estudada, com o intuito de desenvolver métodos alternativos de esterilização para diversos tipos de materiais<sup>8,9,14,20,22,24,30,32,33</sup>. Este processo apresenta uma série de vantagens sobre os métodos tradicionais de esterilização (estufa, autoclave e óxido de etileno), o que inclui o rápido aquecimento, necessitando menor tempo de esterilização<sup>33</sup> e menor consumo de energia<sup>5</sup>, acarretando baixo custo<sup>6</sup>, além de poder ser utilizado continuamente, não necessitando de grande espaço e não aquecendo o ar<sup>30</sup>. Em contrapartida, existem muito poucos sistemas de esterilização por micro-ondas em uso comercial<sup>37</sup>, devido ao fato de este processo requerer o desenvolvimento e aplicação de técnica específica para cada tipo, volume, forma e quantidade de material a ser processado, além do uso de um adequado meio de imersão, principalmente para materiais sólidos<sup>30</sup>.

Para o desenvolvimento e aplicação de um método de esterilização por micro-ondas, é necessário o adequado entendimento da formação e interação das micro-ondas com os materiais. As micro-ondas são geradas a partir de um magnetron e, quando são liberadas para dentro da cavidade do forno, são refletidas pelas paredes metálicas, e da interação entre essas ondas, formam-se as ondas estacionárias (campo eletromagnético), responsáveis pelo aquecimento<sup>29</sup>. O ideal seria a obtenção de um campo eletromagnético uniforme, concorrendo para assegurar que todo o material fosse aquecido. Porém, as ondas estacionárias são também responsáveis pela principal desvantagem dos fornos de micro-ondas para a esterilização: a falta de uniformidade da distribuição da energia<sup>7,13</sup>. Um padrão heterogêneo de energia formado apresenta a magnitude do campo eletromagnético variável de ponto a ponto dentro do forno de micro-ondas com a ocorrência de áreas de alta e

de baixa intensidade de energia<sup>7,13</sup>. A região da cavidade em que ocorre alta intensidade de campo eletromagnético é chamada de *hot-spot* (ponto quente), e possui uma dimensão típica de metade do comprimento de onda<sup>13</sup>. Os mesmos argumentos podem ser aplicados para a caracterização dos pontos de baixa intensidade eletromagnética ou *cold-spots* (pontos frios)<sup>13</sup>. Alguns estudos foram realizados objetivando o desenvolvimento de métodos que minimizassem a ocorrência dos pontos frios e, também, a redução da probabilidade de contato dos objetos com estas áreas. Tais estudos resultaram no desenvolvimento dos pratos giratórios, dos agitadores (*mode stirrers*) e de complexos sistemas de monitoramento da distribuição de energia<sup>7,17,19,20,29</sup>. No entanto, nenhum desses dispositivos ainda é capaz de garantir o completo aquecimento, pois quando esta é situada em diferentes posições do espaço interno do forno, mesmo sobre o prato giratório, diferentes padrões de aquecimento são encontrados<sup>8</sup>.

O padrão de aquecimento da amostra também pode ser modificado por peculiaridades de cada equipamento, como o desenho, a forma e a capacidade, a localização da saída das micro-ondas, além da presença de dispositivos internamente como agitadores e termômetros. Além disso, existe aspectos relacionados a cada material que se deseja esterilizar (profundidade de penetração das ondas, fator de perda dielétrica, calor específico e espessura da amostra)<sup>3,7,13</sup>. Alguns trabalhos já demonstraram que quando uma amostra experimental varia em forma e tamanho e/ou em composição, diferentes padrões de absorção de energia irão ocorrer, afetando não apenas a magnitude do calor gerado, mas também a distribuição espacial da energia dentro da amostra ou entre diferentes amostras<sup>2,7,8,10,13,18,25,30,37</sup>. Existe um consenso de que um determinado volume de óleo aquece mais rapidamente do que o mesmo volume de água. Porém, Basak<sup>4</sup> (1994), Barringer et al.<sup>3</sup> (1994) verificaram que esta relação não é totalmente verdadeira, sendo que diversos parâmetros devem ser considerados quando estas substâncias

são submetidas ao aquecimento por micro-ondas. As propriedades físicas dos líquidos também podem influenciar a resistência bacteriana às micro-ondas<sup>30</sup>, mas muito poucos estudos analisaram a relação entre o tipo e o volume de um líquido e o seu efeito sobre a morte de microrganismos, para determinar a melhor condição para o desenvolvimento de um método de esterilização por micro-ondas.

A eficácia da esterilização por micro-ondas depende, também, diretamente, da relação entre a intensidade do campo eletromagnético e o tempo de exposição da amostra a esse campo<sup>8,30,33,35,36</sup>.

Apesar de já ter sido comprovada a ação letal das micro-ondas sobre os microrganismos, a aplicação clínica de métodos de esterilização utilizando este tipo de energia depende de um protocolo que considere os diversos fatores que possam interferir com a efetividade do método, como, por exemplo, a posição da amostra, capacidade do forno, a potência aplicada, além do tipo e o volume de líquido de imersão (para amostras sólidas) e tempo de exposição.

A viabilidade da aplicação de um método de esterilização, utilizando fornos de micro-ondas domésticos, em clínicas odontológicas depende, portanto, de uma ampla investigação desses fatores que influenciam diretamente na padronização, eficiência e otimização de seu uso. Faz-se necessária a análise da influência da posição do objeto e do meio de imersão, além da inter-relação entre a capacidade do forno, potência e quantidade de instrumentos a serem esterilizados. Somente após o estudo detalhado de todos esses fatores será possível indicar o forno de micro-ondas para a esterilização de fresas *carbide*.

Revisão da literatura

## Revisão da literatura

Youssef, Amin<sup>36</sup> (s/d) estudaram a capacidade de esterilização de um meio de cultura por micro-ondas, variando-se a potência (130, 260, 390 e 520 W) e o tempo de exposição (5, 10 e 15 min). O meio de cultura (MS, Murashige and Skoog, 1962), depois de submetido à irradiação por micro-ondas, foi incubado por três semanas, sendo que os grupos que não foram esterilizados tiveram as bactérias contaminantes (resistentes) identificadas como sendo bacilos. O grupo controle correspondia ao meio de cultura submetido à esterilização em autoclave. O meio de cultura submetido à irradiação por micro-ondas, a 130 W, durante 5 min, apresentou o pior resultado (36% de esterilização) e a completa inibição do crescimento microbiano foi conseguida com a irradiação do meio de cultura a 390 W por 15 min ou a 520 W por 10 ou 15 min. Os autores, a partir dos resultados encontrados, afirmam que o forno de micro-ondas pode ser usado como uma alternativa à autoclave, para a esterilização de meios de cultura.

Em 1977, Latimer, Matsen<sup>14</sup> realizaram experimentos cujo objetivo era avaliar a influência do uso de micro-ondas na inativação de bactérias patogênicas presentes em laboratórios de análises clínicas. As bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas selecionadas (*B. subtilis*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Alpha streptococcus* do grupo D, *Enterococcus* e *S. epidermidis*) foram inoculadas em 50 ml de Tryptic Soy Broth (TSB) e incubadas pelo período noturno a 35°C. Após a incubação, as culturas foram irradiadas por 15, 30, 45 ou 60 segundos. Essas amostras foram diluídas e semeadas em placas de Tryptic Soy Agar (TSA). Também foram utilizadas tiras de papel com esporos de *B. Stearothermophilus*, as quais foram irradiadas pelos seguintes períodos: 15, 30, 45 ou 60

segundos e 2, 3, 4 ou 5 min Após a exposição, as tiras foram inoculadas em TSB e incubadas a 56°C por 72 horas. Em outro experimento, suspensões de esporos de *B. subtilis* foram irradiadas em tempos que variavam entre 15 segundos e 11 min e semeadas em placas de TSA, para quantificação dos esporos viáveis. Os autores testaram, também, a efetividade das micro-ondas nos tempos de exposição de 5, 10, 15 ou 20 min, na esterilização de embalagens autoclaváveis contendo placas de Petri plásticas, com meio de cultura contaminado, e tiras que foram posteriormente incubadas em meio TSB, por 48 horas, a 35°C. Os resultados desse estudo evidenciaram a esterilização das bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas selecionadas, após 60 segundos de exposição às micro-ondas. Por outro lado, as tiras de papel contaminadas com *B. subtilis* não foram esterilizadas após 11 min Os autores puderam concluir que um tempo de exposição às micro-ondas, de 5 min, foi adequado para assegurar a eliminação dos esporos de *B. stearothermophilus*, presentes nas culturas puras, e que o período citado acima também promoveu a esterilização das placas.

Como a causa da letalidade das micro-ondas é desconhecida, Vela, Wu<sup>28</sup>, em 1979, realizaram um estudo para avaliar a natureza desse efeito sobre células microbianas e, também, a influência da quantidade de água na amostra, utilizando-se um forno de micro-ondas doméstico (2.450 MHz; 150 W). Com os resultados, foi possível concluir que, na presença de água, a temperatura da amostra e a inativação das bactérias dependem da quantidade de radiação distribuída dentro da cavidade do forno de micro-ondas. A segunda conclusão a que chegaram é a de que o aumento de temperatura da amostra depende da quantidade de água no microrganismo. Todos os microrganismos falharam em absorver energia suficiente, no estado seco, capaz de promover a inativação, mesmo após longos períodos de irradiação. Segundo os autores, o efeito letal das micro-ondas é somente térmico e,

se existe um efeito não térmico, ele não é bactericida, apesar disso, e considerando-se a possibilidade dessa existência, a água é necessária para a potencialização dos efeitos não térmicos.

Sanborn et al.<sup>22</sup>, em 1982, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da irradiação por micro-ondas na esterilização de placas de Petri plásticas. As placas, de várias marcas e dimensões, foram inoculadas com um dos seguintes microrganismos: *E. coli*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. lútea*, *C. equi*, *B. alvei*, *B. globigii* e *S. faecium*. Após a contaminação, as placas foram submetidas à irradiação, nos períodos de 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 600 segundos. Após a irradiação, as superfícies das mesmas foram recobertas com meio de cultura, incubadas a 37°C, por 48 horas, e avaliadas quanto ao crescimento bacteriano. Os autores também avaliaram se esses recipientes poderiam ser lavados, esterilizados por micro-ondas e reutilizados. Para esses experimentos, as placas utilizadas foram escovadas com detergente, para remoção de células aderentes, e enxaguadas quatro vezes, com água deionizada. Após 2 horas em temperatura ambiente, os recipientes foram irradiados durante os tempos de exposição previamente selecionados. Em seguida, vários tipos de células foram colocados nas placas. Os resultados mostraram que, após 3 min de irradiação, todas as placas contaminadas com as bactérias selecionadas foram esterilizadas. Não foi observada diferença no crescimento das células colocadas nas placas estéreis e novas, em relação ao crescimento nas placas reutilizadas após a exposição às micro-ondas.

Rohrer, Bulard<sup>20</sup> (1985) realizaram um estudo para avaliar a efetividade das micro-ondas na redução da infecção cruzada em consultório odontológico e laboratório de prótese. Foram utilizados: próteses com metal e totalmente de resina acrílica, brocas metálicas e

peças de mão. Os corpos-de-prova foram contaminados com bactérias não esporuladas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*), bactéria aeróbica esporulada (*B. subtilis*), bactéria esporulada anaeróbica (*C. histolyticum*), fungo (*C. albicans*) e vírus (pólio tipo 1 e herpes simplex tipo 1). Para as irradiações no forno de micro-ondas, os corpos-de-prova foram ou não fixados a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores. Os corpos-de-prova contaminados foram submetidos às micro-ondas a uma potência de 720 W, nos períodos de 0, 1, 3, 5, 8, 10, 15 e 20 min e, posteriormente, incubados a 37°C. O crescimento dos microrganismos foi avaliado após 24 e 48 horas, pela análise de turvação do meio e crescimento de colônias em placa Petri. Segundo os autores, os resultados obtidos quando o dispositivo rotacional foi utilizado evidenciaram maior efetividade no tratamento com micro-ondas. Para uma esterilização efetiva de materiais odontológicos, os autores sugeriram a irradiação por micro-ondas associada à utilização do dispositivo tridimensional desenvolvido nesse estudo, por um período de 15 min

Jeng et al.<sup>9</sup>, em 1987, estudaram o mecanismo de esterilização por meio da energia por micro-ondas, em situações de mínima umidade. Este estudo teve por objetivo o desenvolvimento de ciclos mais curtos de esterilização a baixas temperaturas, para a inativação de esporos. Os esporos (*B. subtilis*) foram submetidos às micro-ondas e a um forno convencional de calor seco (estufa), nas temperaturas de 107°, 117°, 130° e 137°C. Após a exposição, foi adicionada água destilada estéril e, em seguida, 1ml dessa amostra foi semeada em placa contendo TSA. Todas as placas foram incubadas a uma temperatura de 30-35°C, por 48 horas. Os resultados mostraram que temperaturas abaixo de 117°C não são efetivas para a esterilização a seco. O tempo total de exposição para reduzir os esporos foi de 75 min, para a temperatura de 130°C, e de 48 min, para 137°C. Os autores não



encontraram diferenças significantes entre o tratamento térmico convencional e o que utiliza a energia de micro-ondas, pois ambos proporcionaram inativação cinética similar, em temperaturas aproximadamente idênticas. Os autores puderam concluir que não houve nenhum efeito não-térmico na irradiação por micro-ondas, e que a atividade esporocida deveu-se ao calor, em ambos os tratamentos.

Kwan-Hoong<sup>13</sup> (1991), em seu estudo sobre o mapeamento da distribuição de energia dentro do forno de micro-ondas, relatou a importância da uniformidade do campo elétrico das micro-ondas, para assegurar o aquecimento, principalmente quando pequenos volumes são irradiados. O autor descreveu a necessidade do uso de béquer com água (carga não definida), no interior do forno de micro-ondas, para a absorção da energia eletromagnética e transformação em energia térmica. Quando um béquer com água é utilizado, maior distribuição e maior uniformidade de energia são alcançadas. Ao aumentar a quantidade de água de 100 ml para 200 ml, ocorreu menor alteração da temperatura, o que pode ser crítico na irradiação de pequenos volumes. Portanto, torna-se necessário o uso de água durante o acionamento do forno de micro-ondas.

Fujikawa et al.<sup>8</sup> (1992) analisaram a cinética da destruição bacteriana após a irradiação por micro-ondas. Neste estudo, foram utilizados: um forno de micro-ondas de modelo doméstico (2450 MHz) e a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. A suspensão bacteriana contida num béquer foi colocada no centro do prato giratório do forno e, então, exposta às micro-ondas, variando-se o período de exposição e a potência (100, 200, 300 e 500 W). Os resultados encontrados foram comparados aos da morte bacteriana após o aquecimento convencional, sendo que se mostraram semelhantes. Para os autores, esse resultado demonstra que

a destruição bacteriana por micro-ondas pode ser explicada pela inativação térmica.

Em 1994, Barringer et al.<sup>3</sup> avaliaram o efeito do volume da amostra de óleo de milho ou de água destilada sobre a velocidade de aquecimento, utilizando-se energia de micro-ondas em um forno de micro-ondas doméstico (600 W) ou em um forno de irradiação unidirecional (2000 W). As amostras foram resfriadas a 3,85°C e aquecidas em um dos fornos, até atingirem a temperatura de 49,85 °C. O tempo necessário para que se atingisse a temperatura final foi utilizado para se proceder à comparação. O tamanho da amostra foi baseado na massa, para o forno de micro-ondas doméstico (20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, e 1000 g), e no raio da base do cilindro graduado, no qual foram colocadas as amostras, para o outro equipamento (0,21, 0,30, 0,43, 0,49, 0,56, 0,60, 0,73, 0,77, 0,80, 0,87, 0,95, 1,00, 1,11, 1,21, 1,35, 1,42, 1,80, 2,40, 3,04 e 3,90 cm). As amostras foram posicionadas no centro do forno doméstico e em uma posição previamente definida, no outro equipamento. Os autores verificaram que, para o forno de micro-ondas doméstico, considerando-se amostras pequenas (20 a 300 g), a velocidade de aquecimento é muito maior da água do que do óleo (até dez vezes mais). Porém, para amostras maiores (300 a 1000 g), as duas substâncias apresentam comportamento similar, de menor velocidade de aquecimento, sendo que o óleo aquece ligeiramente mais rápido do que a água. O comportamento foi semelhante entre os dois fornos, apesar de haver grande oscilação da temperatura da água, no forno com incidência unidirecional.

Em 1994, Kok et al.<sup>11</sup> desenvolveram um forno de micro-ondas automatizado para ser utilizado em laboratórios, que possibilitava a programação de maior quantidade de funções do que os aparelhos disponíveis no mercado. O forno possibilitava a programação da

quantidade de ciclos de liberação da energia eletromagnética por segundo de exposição, análise da temperatura do substrato no exato momento da irradiação, velocidade de rotação do prato giratório, além dos convencionais ajustes de potência e de tempo de exposição. Foram também realizados experimentos que visavam à comparação da influência do substrato sobre a velocidade da temperatura atingida. Assim, foram irradiados: água (100 ml e 250 ml), álcool (100 ml e 250 ml) e parafina (250 ml) adicionada ou não de um material rádio-absorvente (Weflon). Segundo os autores, a programação mais específica das funções do forno de micro-ondas é fundamental para que este possa ser utilizado em laboratórios. Além disso, os experimentos realizados neste forno demonstraram que o volume e o tipo de substrato interferem no grau e na velocidade de aquecimento, pois a velocidade de aquecimento foi, em ordem decrescente: parafina com Weflon, 100 ml de álcool, 250 ml de álcool, 100 ml de água, 250 ml água e parafina sem Weflon.

Rosaspina et al.<sup>21</sup>, em 1994 estudaram o efeito esterilizante de um novo sistema de esterilização em micro-ondas, sobre os seguintes microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxitocica*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*. Lâminas de bisturi foram contaminadas por cada microrganismo, individualmente, e, depois de secas, foram completamente imersas em um béquer de vidro contendo água destilada em temperatura ambiente. O conjunto foi exposto às ondas eletromagnéticas (2400 MHz), emitidas por um forno de micro-ondas para esterilização, a 600W (Sterivelox S90S), por períodos de exposição variados e, posteriormente, os instrumentos foram semeados e incubados (37°C, 48 horas), para verificação do crescimento bacteriano. Foi conseguida esterilização ao final de 3 min de exposição. Alterações morfológicas celulares foram proporcionais ao tempo de exposição. Os autores concluem que o método proposto permite uma esterilização

rápida e eficaz de lâminas de bisturi, e que o efeito letal não é somente térmico, mas, também, das micro-ondas.

Papadopoulou et al.<sup>16</sup>, em 1995, realizaram um estudo para determinar o efeito bactericida das micro-ondas em certas espécies de enterobactérias patogênicas, normalmente encontradas em alimentos (*Escherichia coli*, *Salmonella Sofia*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*), em comparação com o efeito bactericida do aquecimento convencional. Os meios de cultura com cada um dos tipos de bactéria foram expostos à irradiação por micro-ondas (2450 MHz, 650 W) e ao aquecimento convencional (ebulição) em chama de bico de Bunsen. Os resultados demonstraram que, nas exposições de menos de 20 segundos, a maioria dos microrganismos sobrevive, porém, sendo totalmente eliminados após uma exposição de 30 segundos. Os autores puderam concluir que o efeito das micro-ondas é mais rápido do que o efeito proporcionado pela ebulição.

Alguns fabricantes relatam a possibilidade de submeter instrumentos rotatórios, utilizados para polimento de restaurações, a processos de desinfecção e/ou esterilização, como forma de reutilizá-los, ao invés de descartá-los após o uso. Assim, Tate et al.<sup>27</sup>, em 1995, se propuseram a avaliar a eficácia de vários métodos de desinfecção e esterilização, em dois tipos de instrumentos de acabamento e polimento de resinas compostas. Os tratamentos incluíam imersão em soluções desinfetantes por 18 horas (iodo, glutaraldeído e fenol sintético), esterilização física (micro-ondas-750W e 6 min, e autoclave-121°C e 15 min) ou físico-química (Quimiclave - 132°C e 30 min). A eficácia dos métodos era avaliada por meio de análise microbiológica da turvação do meio de cultura contendo os instrumentos, após o procedimento de esterilização. Dentre os métodos de esterilização avaliados, as esterilizações física e físico-química foram eficientes e confiáveis, porém,

dentre os métodos químicos, somente o glutaraldeído apresentou resultados confiáveis. Portanto, apesar da limitação de desinfecção química e da possibilidade de degradação de instrumentos por métodos físicos e físico-químicos, os autores relatam que, quando se tenciona reutilizar os instrumentos, os mesmos deverão ser esterilizados, caso contrário, deverão ser descartados.

Atmaca et al.<sup>1</sup> (1996) realizaram um estudo para avaliar o efeito da irradiação por micro-ondas (2450 MHz, 550W) e da aplicação convencional de calor por diversos períodos, sobre as características reprodutivas de bactérias e, também, para verificar a influência do volume líquido de colônias expostas às micro-ondas. Foram utilizadas três culturas de bactérias (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas acidovorans*), em dois volumes diferentes: 1ml e 5ml. Estas foram expostas à irradiação por micro-ondas, em períodos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 e 30 segundos. Culturas semelhantes foram expostas ao calor convencional, por períodos de 16 (85,1°C), 20 (91°C), 25 (91,3°C) e 30 (92°C) segundos, determinados pela aferição da temperatura obtida nos períodos de exposição às micro-ondas. Observou-se que quanto maior o volume líquido, maiores são os efeitos inibitórios da irradiação por micro-ondas sobre as bactérias, indicando que a quantidade de líquido na amostra tem papel importante na absorção da energia da irradiação por micro-ondas. Além disso, obteve-se a completa inibição das bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, com 30 segundos de irradiação, e das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas acidovorans*, com 25 segundos. Utilizando-se a mesma temperatura, a inativação das bactérias foi atingida com 30 segundos de exposição em micro-ondas, sendo que o mesmo ocorreu somente com 1 a 2 min de exposição da amostra ao aquecimento convencional, indicando que a

irradiação por micro-ondas inibe as bactérias de maneira diferente daquela obtida apenas pelo calor.

Um estudo realizado por Wu<sup>33</sup>, em 1996, avaliou o efeito da energia de micro-ondas em bactérias (*Bacillus subtilis* var. *nigar*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), em diferentes condições, e buscou identificar o melhor período e potência para a esterilização. Foi fabricado um aparelho de micro-ondas específico para o estudo, com um circuito similar ao forno de micro-ondas de modelo doméstico ( $2450 \pm 30$  MHz; potência máxima de 650 W). Foram contaminados pratos de porcelana e embalagens de papel para comida, colocando-se discos de papel em suas superfícies. Após a contaminação, cada material foi submetido à irradiação por diferentes períodos (20, 30, 40, 45 min) e densidade de potências ( $11,5 \text{ W/cm}^2$  e  $6,5 \text{ W/cm}^2$ ). Em seguida, os discos de papel foram retirados, colocados em ágar nutriente e incubados. Foram feitas leituras de 24, 48 e 72 horas. Os resultados mostraram que diante da variação da densidade de energia de radiação, o período necessário para matar todas as bactérias é diferente; o período de exposição também é diferente, dependendo do microrganismo. Pode-se concluir que as condições para que se eliminem todas as bactérias não dependem somente do tempo de exposição e dos objetos utilizados, mas, também, da intensidade de energia (potência) e do tipo de bactéria. Segundo o autor, o *Bacillus subtilis* var. *nigar* pode ser considerado a bactéria indicadora para a desinfecção por micro-ondas, já que, no tempo necessário para a sua eliminação, todas as outras bactérias já foram eliminadas.

Em 1997, Tarantino et al.<sup>26</sup> realizaram um estudo para avaliar a eficácia da irradiação por micro-ondas, para ser utilizada como método de esterilização em consultórios odontológicos. Espelhos bucais foram contaminados por 0,1 ml de uma suspensão bacteriana mista

(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*) e, posteriormente, submetidos à irradiação por micro-ondas (4 min), imersos em solução de NaCl 0,9% ou “líquido coadjuvante”. O forno de micro-ondas utilizado neste estudo é um modelo comercialmente avaliado para a esterilização, apresentando um dispositivo que permite a propagação uniforme das ondas, e é acompanhado do “líquido coadjuvante”. Os autores puderam constatar que a efetividade da esterilização depende do meio de imersão utilizado, sendo que a utilização do “líquido coadjuvante” promoveu a morte microbiana, assim como um aumento de temperatura considerável da amostra (90°C a 94°C), enquanto que a imersão em solução fisiológica não promoveu a morte dos microrganismos, no mesmo período, e o aumento da temperatura não foi tão significativo (49°C a 60°C).

Tanaka et al.<sup>25</sup>, em 1998, demonstraram a eficiência da esterilização de toalhas, utilizando a energia de micro-ondas. O teste foi realizado pela contaminação de toalhas, com uma gaze contendo solução salina, com aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/ml, sendo que o conjunto foi envolvido com papel filme para a irradiação. Após a irradiação, a gaze foi transferida da toalha para um caldo (Sabouraud broth) e submetido à diluição seriada, para a contagem de células viáveis. Foi comparado o tempo de exposição necessário (0,1 ou 2 min) para a esterilização de toalhas de 2 dimensões diferentes e, também, da irradiação de 1 ou 3 toalhas simultaneamente. Todos os microrganismos testados (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) foram eliminados após 1 minuto de exposição em forno de micro-ondas doméstico, em qualquer condição avaliada.

Como os principais constituintes da placa em bases de próteses são *Streptococcus gordonii* e *Candida albicans*, Webb et al.<sup>32</sup> (1998), realizaram um estudo para avaliar a eficácia da esterilização por

micro-ondas, na inativação desses microrganismos. Para a realização do experimento, bases de próteses totais superiores foram confeccionadas e esterilizadas em autoclave e, posteriormente, contaminadas com *C. albicans* e *S. gordonii*. Após a contaminação, as bases foram submetidas a um dos métodos de esterilização: a) esterilização em forno de micro-ondas doméstico, em diferentes potências e períodos de irradiação, e b) esterilização por meio da imersão em hipoclorito de sódio a 0,02%, por 8 horas. A esterilização em forno de micro-ondas é mais efetiva do que a imersão em hipoclorito, desde que sejam utilizados 350 W de potência e 6 min de irradiação ou 604 W e 2 min de exposição.

Yeo et al.<sup>35</sup>, em 1999, analisaram a inativação de *Staphylococcus aureus*, presentes em discos de aço inoxidável, quando submetidos à irradiação por micro-ondas, operando-se em frequência de 2450 MHz e potência de 800W. Foram utilizados discos de aço inoxidável com 15 mm de diâmetro e 5 mm de espessura, autoclavados e mantidos em fluxo laminar por 1 hora para secar; pirex de vidro para forno de micro-ondas; pinças estéreis e bactérias da espécie *S. aureus*, mantidas em meio de cultura fluido. A solução bacteriana foi pipetada sobre a superfície dos discos de aço, o conjunto foi colocado sobre o pirex de vidro e posicionado no centro do prato giratório do forno de micro-ondas. A completa inativação da suspensão bacteriana foi alcançada em 110 segundos. Os autores puderam concluir que a esterilização de *S. aureus* em forno de micro-ondas deve-se, principalmente, à transferência de calor através do substrato metabólico e, em menor parte, à energia absorvida diretamente pelas micro-ondas.

Com o intuito de investigar mais detalhadamente o mecanismo de inativação microbiana por meio da irradiação por micro-ondas, Watanabe et al.<sup>31</sup>, em 2000, estudaram os efeitos dos compostos iônicos na inativação de microrganismos. Os autores utilizaram um forno



de micro-ondas modelo doméstico (2450 MHz, 500W) e os microrganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Foram irradiados tubos de ensaio contendo 3 ml de suspensão microbiana, posicionados dentro de um frasco Erlenmeyer contendo 90 ml de água destilada. À suspensão, eram adicionadas diferentes quantidades de compostos iônicos (NaCl, KCl ou sacarose), para a verificação do efeito da composição do substrato sobre a morte microbiana. Os autores puderam concluir que: a) o efeito da energia por micro-ondas sobre os microrganismos deve-se, principalmente, ao calor gerado nas células em suspensão e b) quanto maior a concentração dos compostos iônicos nas células em suspensão, maior o número de células desativadas.

Em 2001, Atwater et al.<sup>2</sup>, desenvolveram um equipamento que permitia um rápido aquecimento por micro-ondas para facilitar a transferência asséptica de nutrientes, produtos e outros materiais entre sistemas microbiologicamente sensíveis e o ambiente externo. Esse equipamento consistia de um magnetron emitindo radiação de micro-ondas a 600 W de potência em uma frequência de 2,45 GHz, uma cavidade de esterilização e uma interface de transferência da amostra. A energia era liberada para dentro da cavidade através de uma linha de transmissão coaxial, onde pequenas quantidades de água eram liberadas simultaneamente com a radiação para a produção de vapor superaquecido. Após o estudo, verificou-se que a eficiência da transferência de energia é aumentada pela presença de materiais suscetíveis à absorção de micro-ondas dentro da cavidade do aparelho. As paredes internas do aparelho são termicamente esterilizadas pelo contato direto com o gás aquecido. A eficiência de esterilização do método proposto foi comprovada pela utilização de *Bacillus stearothermophilus*.

Considerando que a forma de aquecimento por micro-ondas depende de diversos aspectos relacionados aos fornos e ao substrato irradiado, Diprose<sup>7</sup>, em 2001, publicou uma revisão de literatura na qual descreve uma técnica de aquecimento dielétrico e, também, alguns experimentos que ilustram determinados fatores a serem considerados, quando se tem a intenção de utilizar fornos de micro-ondas em laboratórios, adequadamente. O autor atesta que o tamanho e a forma da amostra, assim como suas propriedades físicas, determinam a absorção da energia. O mesmo também afirma que a maioria dos fornos de micro-ondas não permite um ajuste preciso do nível de potência e que, não sendo este aspecto devidamente observado, pode-se chegar a conclusões errôneas, quando se tratar de experimentos envolvendo diferentes níveis de potência.

A esterilização de alimentos sólidos por micro-ondas foi estudada por Zhang et al.<sup>37</sup>, em 2001, utilizando um modelo matemático e sua confirmação experimental. A equação de Maxwell e a equação de condução de calor foram aplicadas utilizando-se dois programas diferentes de elementos-finitos. A distribuição espacial de tempo-temperatura, representando a esterilização, foi calculada pelo histórico de tempo-temperatura experimentalmente determinado. Experimentalmente, concentrações de compostos marcadores formados durante o aquecimento foram medidas e transformados nos índices de tempo-temperatura. Os dados experimentais combinados com os cálculos numéricos fornecem uma imagem precisa e compreensível do processo de esterilização e representam um importante passo no estabelecimento da eficácia dos processos de esterilização por micro-ondas. Segundo os autores, ao contrário do que ocorre nos métodos de esterilização convencional, o padrão de aquecimento por micro-ondas pode variar qualitativamente com a geometria (forma e tamanho) e propriedades

(composição) dos alimentos, mas a esterilização é possível desde que todos esses fatores sejam considerados.

Melly et al.<sup>15</sup>, em 2002, avaliaram as propriedades de esporos de *B. subtilis* preparados em diferentes temperaturas (de 22° C a 48° C). Diversos aspectos dos esporos foram considerados, tais como a quantidade de ácido dipicolínico e pequenas proteínas, que se apresentaram em quantidades idênticas nas condições avaliadas. Porém, o conteúdo de água foi menor nos esporos preparados em temperaturas elevadas. Os esporos preparados em temperaturas elevadas são mais resistentes ao calor úmido e a diversos métodos de esterilização, do que aqueles preparados em temperaturas mais baixas, apesar de esses diferentes processos de produção não terem afetado a resistência ao calor seco e à radiação U.V.

Kopyt, Celuch-Marcysiak<sup>12</sup>, em 2003, desenvolveram um modelo de elemento finito para auxiliar o mapeamento da distribuição da energia dentro da cavidade de fornos de micro-ondas domésticos, considerando a rotação do objeto durante a irradiação. Foi realizado um experimento para a verificação da simulação desenvolvida, utilizando objetos de composições diferentes (carne e pão). Os experimentos comprovaram a eficácia do modelo computadorizado proposto. Os autores verificaram que a composição e forma do objeto interferem na absorção da energia, e seu posicionamento deve ser considerado durante a irradiação em fornos de micro-ondas domésticos.

Uma análise detalhada do aumento de temperatura promovido pelas micro-ondas foi realizada por Basak<sup>4</sup>, em 2004, que comparou o aquecimento de diferentes emulsões de óleo/água, água/óleo, água e óleo. Foram comparadas a temperatura máxima atingida e as características dielétricas das amostras, após irradiação

unidirecional ou bidirecional. Verificou-se que a capacidade de absorção de energia de micro-ondas da água é muito superior ao óleo. Quando diferentes níveis de potência foram empregados, pôde-se observar a correlação diretamente proporcional entre o nível de potência e o grau de aquecimento da amostra. Maiores temperaturas foram conseguidas quando a amostra recebeu a incidência bidirecional de radiação.

Para a comparação entre os efeitos exercidos pelas micro-ondas e o exercido pelo aquecimento convencional, sobre a estrutura molecular de esporos de *Bacillus subtilis*, Celandroni et al.<sup>6</sup>, em 2004, desenvolveram um equipamento de micro-ondas específico para gerar um campo eletromagnético de distribuição uniforme e constante (100 W). Uma alíquota de 0,25 ml de esporos diluídos em 0,1% NaCl ( $5 \times 10^7$  UFC/ml) foi submetida à irradiação ou ao aquecimento em banho de água, por diferentes períodos. Foram comparados os efeitos sobre as características moleculares dos esporos, assim como o tempo de aquecimento necessário para a esterilização. A viabilidade dos esporos irradiados foi similar à das amostras submetidas ao aquecimento convencional, para os mesmos intervalos de tempo, e a completa eliminação dos esporos foi conseguida após 20 min de aquecimento da amostra. Apesar desse fato, os danos induzidos aos esporos, pelas micro-ondas, foram significativamente diferentes daqueles atribuídos pelo calor. Segundo os autores, esses resultados demonstram que as micro-ondas induzem modificações nos componentes estruturais e/ou moleculares dos esporos que diferem dos efeitos atribuídos somente ao calor.

Vollmer<sup>29</sup>, em 2004, publicaram um estudo que descreve o mecanismo de funcionamento de fornos de micro-ondas e a forma de aquecimento das amostras. Em seu estudo, são descritas a formação das micro-ondas, incluindo o funcionamento do magnetron, guias de ondas e as “ondas retas” que se formam dentro da cavidade do forno. São

considerados os mecanismos de absorção das micro-ondas e discutidos aspectos como características dielétricas da água, profundidade de penetração das ondas eletromagnéticas e possíveis modificações químicas durante o aquecimento por micro-ondas.

Em 2005, Kelen et al.<sup>10</sup> desenvolveram um método para facilitar a seleção do diluente que favorecesse a melhor uniformidade da temperatura de amostras submetidas à irradiação por micro-ondas a vácuo. Para a definição do método proposto, os autores utilizaram a comparação entre experimentos práticos, que utilizavam o monitoramento da temperatura da amostra irradiada, e a técnica proposta, de “termografia 3D”. Foram comparadas amostras de 2 materiais comumente utilizados como diluentes de produtos farmacêuticos, que possuíam composição e características bastante diferentes. A eficácia do método proposto foi comprovada como facilitador da seleção do diluente, contanto que as características do material sejam conhecidas (propriedades térmicas e dielétricas). A “termografia 3D” desenvolvida proporciona informações confiáveis e reproduzíveis, a respeito da distribuição da temperatura dentro da amostra.

Considerando que a utilização de agitadores (*mode stirrers*) é uma excelente opção para a minimização dos pontos quentes, Plaza-Gonzales et al.<sup>18</sup>, em 2005, compararam o efeito da forma do agitador sobre a uniformidade do campo elétrico dentro de uma amostra exposta às micro-ondas. Comparou-se o efeito da movimentação horizontal e angulada do agitador (folhas metálicas) sobre a absorção da energia, em amostras de diferentes graus de perda dielétrica (baixo, médio ou alto). Além disso, um sistema computadorizado de monitoramento das ondas eletromagnéticas foi testado, como uma alternativa para se calcular a distribuição do campo eletromagnético dentro da amostra. Embora a comparação entre o tipo de agitador e a permeabilidade da amostra não

tenha apresentado resultados conclusivos, o método computadorizado proposto apresentou resultados bastante aproximados, a respeito da distribuição da energia em amostras com alto e médio grau de perda dielétrica.

Requena-Pérez et al.<sup>19</sup>, em 2005, avaliaram diversos fatores que poderiam influenciar na determinação da posição mais eficiente da amostra em uma cavidade, considerando-se também o tamanho da cavidade do forno. Foi utilizado um equipamento que possibilitava a movimentação da amostra durante o aquecimento. Durante esse processo havia o monitoramento da energia absorvida pela amostra em cada uma das posições, até que a posição ideal fosse encontrada. Foram consideradas cinco condições: localização da amostra, permeabilidade, forma da cavidade, tamanho da cavidade e frequência empregada. Os autores observaram que a relação entre frequência empregada e a dimensão da cavidade é crítica. Em grandes cavidades ocorrem maiores oscilações da magnitude da absorção das micro-ondas em função da posição da amostra do que em cavidades menores.

Wang et al.<sup>30</sup>, em 2003, avaliaram o efeito letal das microondas de soluções tamponadas contendo esporos de *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* submetidas a diferentes condições de irradiação em forno de microondas doméstico. Avaliou-se o efeito da concentração de sais minerais através da adição de diferentes soluções salinas à solução teste ( $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$  ou  $\text{KCl/K}_2\text{CO}_3$ ) incubação e irradiação. Adicionalmente foi analisada a influência da viscosidade, através da adição de amido (0,2; 0,5; 0,8; 1 e 1,5%) imediatamente antes da irradiação. Cada amostra foi submetida à irradiação (700 W) até a morte microbiana, verificada pela contagem de colônias. Os resultados do estudo revelaram que a adição de sal à solução teste interferiu na pressão osmótica e que a adição de  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{KCl/K}_2\text{CO}_3$  foram os mais

favoráveis à esterilização. O aumento da viscosidade da amostra também alterou a resistência dos microrganismos à irradiação, sendo que quanto menor a quantidade de amido adicionado, maiores os efeitos letais das microondas.

Em 2005, Yaghmaee, Durance<sup>34</sup> estudaram o efeito da radiação de micro-ondas (2450 MHz) à vácuo sobre a morte de *Escherichia coli*, na busca por possíveis efeitos não-térmicos. Foram comparados os efeitos em culturas microbianas submetidas a vácuo ao aquecimento em banho de água ou por micro-ondas, sendo o vácuo utilizado para o controle do ponto de ebulição da água e para manter a temperatura da suspensão bacteriana até níveis específicos. As culturas foram esterilizadas a 91°C quando submetidas ao banho de água, enquanto que em 62 °C e 59°C quando irradiadas a 510 W e 711 W, respectivamente, o que sugere, segundo os autores, uma maior sensibilidade dos microrganismos às variações de temperatura quando aquecidos por micro-ondas.

Setlow<sup>23</sup>, em 2006, publicou um artigo de revisão da literatura a respeito do mecanismo de resistência e esterilização de esporos de *B. subtilis* submetidos à radiação, calor e produtos químicos. Após a análise de 75 artigos, o autor afirmou que muitos mecanismos são responsáveis pela resistência ou morte dos esporos de diferentes espécies de *Bacillus*. A resistência ao calor úmido é determinada principalmente pela pequena quantidade de líquido do esporo, mas também estão envolvidos neste mecanismo a concentração de íons minerais e a estabilidade intrínseca das proteínas.

Em 2007, Benjamin III et al.<sup>5</sup> investigaram o tempo de exposição necessário para a esterilização de culturas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na presença de íons

cobalto e férrico, submetidas à irradiação por micro-ondas doméstico (130 W). Todos os microrganismos foram eliminados após 3 min de exposição. O tempo para a eliminação de qualquer um dos microrganismos testados foi menor quando imerso em solução iônica, quando comparado ao controle (água). *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram mais sensíveis ao cobalto e ao ferro, respectivamente. Segundo os autores, a rápida redução de bactérias viáveis durante a irradiação na presença de íons metálicos pode ser explicada pela penetração desses íons na bactéria.

Uma técnica para melhorar a uniformidade do padrão de aquecimento de amostras numa cavidade ressonante foi apresentada por Pedreño-Molina et al.<sup>17</sup>, em 2007. Em seu trabalho, um sistema informatizado simulou a interação entre as características da amostra (permeabilidade e tamanho) e sua posição dentro da cavidade do forno de micro-ondas, com a temperatura atingida durante a irradiação. O método proposto mostrou-se eficaz na simulação das condições de irradiação em fornos de micro-ondas, permitindo a determinação das posições mais favoráveis ao aquecimento de diferentes tipos de amostras. Segundo os autores, o monitoramento automático do aquecimento, e a movimentação inteligente e não uniforme da amostra proporcionados pelo programa desenvolvido possibilita melhores padrões de aquecimento.

Takashima et al.<sup>24</sup>, em 2007, desenvolveram um método de esterilização pelo qual a energia de micro-ondas elimina *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, utilizando uma placa metálica na produção do material catalisador. Foi confeccionada uma placa metálica ( $\text{SiO}_2$  ou  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$ ), impregnada com Pt ou Ag, que, em contato com a radiação de micro-ondas, produzia radicais hidroxila como catalisador para a esterilização. Amostras de culturas de *E. coli* e *B. subtilis* (10  $\mu\text{l}$ ), irradiadas dentro desta placa, foram esterilizadas em um tempo muito menor do que o



necessário para os métodos convencionais de esterilização (30 segundos a 100 W). Os resultados indicaram que o íon metálico de cobertura absorveu a energia eletromagnética mais fácil e rapidamente, e que a reação química provocada produziu radicais hidroxila, que desempenham importante papel na esterilização dos microrganismos.

**Proposição**

## Proposição

Este estudo foi avaliado o tempo de exposição necessário para esterilização, em forno de micro-ondas doméstico, de fresas *carbide* contaminadas por *B. subtilis*, *C. albicans* e *E. coli* considerando:

- Disposição espacial da amostra na cavidade do forno (sentidos vertical e horizontal);
- Meio de imersão das fresas (presença, tipo e volume);
- Nível de potência, capacidade dos fornos de micro-ondas e quantidade de instrumentos irradiados simultaneamente.

## Material e método

## Material e método

Toda a etapa experimental foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taís Maria Bauab.

O trabalho foi realizado em três etapas consecutivas. Inicialmente, avaliou-se a influência da posição da amostra dentro do forno de micro-ondas, fase em que se determinaram as posições mais favoráveis e menos favoráveis à esterilização. No segundo estágio, utilizou-se a posição da amostra mais favorável à esterilização, para a avaliação da influência do meio de imersão, na definição da relação tipo de meio X volume, mais favorável à esterilização das fresas *carbide*. Finalmente, valendo-se das informações colhidas nessas etapas anteriores, considerou-se a influência da capacidade do forno de micro-ondas, da quantidade de fresas irradiadas ao mesmo tempo e da potência empregada sobre o tempo de exposição necessário para a esterilização, para possibilitar a definição de um protocolo de esterilização de fresas *carbide* em fornos micro-ondas domésticos.

A metodologia foi subdividida em 3 etapas distintas:

Etapa 1 - Avaliação do efeito da disposição espacial da amostra na cavidade do forno;

Etapa 2 - Avaliação do efeito da presença e volume de um meio de imersão em contato com as fresas;

Etapa 3 - Avaliação da influência do nível de potência, capacidade do forno de micro-ondas e quantidade de instrumentos irradiados simultaneamente.

Os experimentos foram realizados em 5 estágios consecutivos: 1 Obtenção das cepas de microrganismos; 2 Padronização do inóculo; 3 Preparação da amostra (contaminação seletiva); 4 Procedimento de irradiação (condições experimentais); 5 Avaliação do efeito antimicrobiano das micro-ondas. Apenas os estágios 3 e 4 foram diferentes, de acordo com a etapa desenvolvida (1,2 ou 3)

## 1 Cepas de microrganismos

Para uma maior abrangência de resultados, foram utilizadas três diferentes modalidades de microrganismos: *Escherichia coli* (bactéria gram negativa, ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (bactéria gram positiva, ATCC 19659) e *Candida albicans* (levedura, ATCC 18804).

Os microrganismos foram semeados em meio fluido específico (caldo), sendo os dois primeiros semeados em Tryptic Soy Broth (TSB) (DIFCO, Detroit, Michigan, EUA) e a levedura em caldo Saboreaud (DIFCO, Detroit, Michigan, EUA). Posteriormente, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido específico para *E. coli* e *B. subtilis* (TSA - Tryptic Soy Agar) e para *C. albicans* (Saboreaud Agar), que representaram o estoque. Esses tubos foram incubados em estufa bacteriológica, a 37°C, por 24-48h (*E. coli* e *B. subtilis*), ou em estufa incubadora para B.O.D, a 28°C, por 48-72h (*C. albicans*).

Para assegurar a predominância de esporos (forma resistente), na última etapa do trabalho, o estoque de *B. subtilis* foi produzido a partir da transferência do microrganismo do caldo (TSB) para tubos de ensaio contendo meio sólido, preparado pela adição de 7,5 g de extrato de carne bovina, 12,5 g de peptona e 15 g de ágar, a 1 l de água. Após a semeadura, os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica, a 37°C, por 72 h, e a proporção de esporos e bacilos foi verificada pela análise, em microscópio óptico, de lâminas coradas pela técnica de Wirtz. Somente foram utilizados como estoque de *B. subtilis*, nesta última etapa do trabalho, aqueles tubos de ensaio que continham esporos na proporção igual ou superior a 50%.

## 2 Padronização do Inóculo (suspensão microbiana)

O inóculo foi produzido individualmente para cada microrganismo. Para isso, alçadas do estoque foram dispensadas em um frasco de vidro com tampa de rosca, contendo solução tamponada de

fosfatos (PBS), a aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Para a padronização, foi utilizada comparação visual com a Escala 0,5 de McFarland e leitura em espectrofotômetro a 600 nm (D.O.=0,4).

### **3 Preparação da amostra – contaminação seletiva**

Etapa 1: Para a avaliação da influência da posição da amostra sobre a esterilização, 10 ml de água deionizada estéril, contida em frasco graduado com tampa de rosca (50 ml), foram contaminados por 500 µl do inóculo de uma das culturas microbianas. O frasco foi fechado imediatamente antes da irradiação, para evitar a dissipação de calor, tendo meia volta da tampa desrosqueada, para evitar o aumento de pressão dentro do mesmo durante a fervura, o que poderia desencadear uma explosão dentro do forno.

Etapas 2 e 3: Fresas *carbide* cilíndricas lisas (H21.010.314-Komet, Brasseler USA, Savannah, GA), previamente esterilizadas por óxido de etileno (ACECIL - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, Campinas, SP), foram imersas no inóculo de um dos microrganismos durante 5 min, para serem utilizadas nas demais etapas do trabalho. As fresas contaminadas foram transferidas para um frasco com tampa de rosca, vazio, ou contendo água deionizada ou óleo mineral (Nujol, Indústria Química Farmacêutica Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro, Brasil) estéreis, para serem submetidas à irradiação (Etapa 2). Na Etapa 3, utilizou-se a condição de imersão mais favorável à esterilização, definida na segunda etapa do trabalho.

### **4 Procedimento de irradiação (condições experimentais)**

Etapa 1: Cada frasco foi individualmente posicionado sobre o prato giratório do forno de micro-ondas doméstico (Brastemp BMK-38, Manaus, AM, Brasil; 2450 MHz, 580 W), em uma das 15 posições determinadas pela combinação entre as cinco posições horizontais (Figura 1) e as três alturas (Figura 2). As amostras foram irradiadas por

diferentes períodos (0,5, 1, 2, 5, 6, 7 ou 8 min), até a esterilização. Para confirmação do efeito da radiação por micro-ondas um frasco, aleatoriamente selecionado, não foi submetido à exposição às micro-ondas. Além disso, um frasco não era contaminado, para a confirmação da contaminação seletiva.

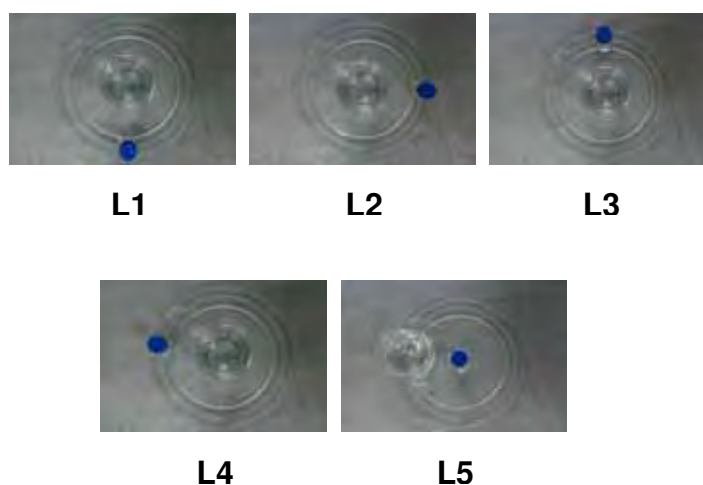


FIGURA 1 - Posições avaliadas: L1-anterior, L2-lateral-direita, L3-posterior, L4-lateral-esquerda, L5-central.



FIGURA 2 - Alturas avaliadas: H0 - ao nível do prato giratório, H3 - a 3 cm do prato giratório, H5 - a 5 cm do prato giratório.

Etapa 2: Utilizou-se a posição mais favorável à esterilização, definida na etapa anterior, para o posicionamento do frasco contendo a somente fresa contaminada (grupo controle – A) ou a mesma em contato



com 2 ou 10 ml de água deionizada (grupo B) ou óleo mineral (Nujol, Indústria Química Farmacêutica Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro, Brasil) (grupo C).

Etapa 3: Para a avaliação da influência da capacidade do forno, da quantidade de instrumentos irradiados ao mesmo tempo e da potência a ser empregada, o frasco de vidro contendo diferentes quantidades de fresas contaminadas (1, 5 ou 10 – Tabela 1) foi disposto em um dos fornos de micro-ondas (27 l ou 38 l - Tabela 2), na posição menos favorável à esterilização, definida na primeira etapa deste estudo e na condição de imersão mais favorável, definida na Etapa 2. Então, o aparelho de micro-ondas foi acionado a aproximadamente 400 ou 600 W (Tabela 3), por 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 9,5; 10; 11; 13 ou 14,5 min, ou seja, até que fosse obtida a esterilização das fresas.

Os níveis de potência foram empregados conforme o indicado no manual do forno, porém, a potência real de trabalho foi calculada segundo a norma internacional IEC 305, de acordo com a indicação direta do fabricante, ou seja,  $P = 4,187 \times M_w \times (T_2 - T_1) + 0,55 \times M_r \times (T_2 - T_0) / t$ , onde: P = Potência de Saída;  $M_w$  = Massa da água;  $T_2$  = Temperatura final da água;  $T_1$  = Temperatura inicial da água deionizada (1litro);  $M_r$  = Massa do recipiente;  $T_0$  = Temperatura ambiente; t = tempo de aquecimento da água durante o teste, excluindo-se o tempo de aquecimento do filamento do magnetron.

Tabela 1 - Quantidade de instrumentos

| Sigla | Quantidade de fresas |
|-------|----------------------|
| Q 1   | 1                    |
| Q 2   | 5                    |
| Q 3   | 10                   |

Tabela 2 - Capacidade do câmara interna do forno de micro-ondas modelo doméstico

| Sigla | Forno                   | Marca                           | Capacidade |
|-------|-------------------------|---------------------------------|------------|
| F1    | Jet Frost Crisp BMK 27A | Brastemp, Multibras, Manaus, AM | 27 litros  |
| F2    | Jet Frost Crisp BMK 38A | Brastemp, Multibras, Manaus, AM | 38 litros  |

Tabela 3 - Níveis de potência

| Sigla | Potência |
|-------|----------|
| P1    | 400 W    |
| P2    | 600 W    |

Em todas as condições experimentais, um béquer de vidro (Satelit, HS100) contendo 1 litro de água, em temperatura ambiente, foi colocado sobre o prato giratório, juntamente com o substrato, durante a irradiação, para evitar o superaquecimento e visando que o mesmo agisse como carga, absorvendo a radiação dissipada dentro da cavidade e reduzindo a possibilidade de retorno para o magnetron<sup>3,7,23</sup>, e para melhorar a distribuição da energia dentro da cavidade do forno<sup>1,13,23</sup>.

## 5 Avaliação do efeito antimicrobiano das micro-ondas

Ao final do período de irradiação, ao conteúdo restante do frasco com tampa (substrato) foram adicionados 10 ml de meio fluido específico para o microrganismo, e este conjunto foi incubado em estufa bacteriológica, a 37 C, por 24-48h (*B. subtilis* e *E. coli*), ou em estufa incubadora para B.O.D, a 28 C, por 48-72h (*C. albicans*), e o forno foi resfriado até que todas as paredes de sua cavidade se mostrassem novamente frias.

Para a análise do crescimento microbiano, as leituras foram realizadas a cada vinte e quatro horas e os dados colhidos foram tabulados, observando-se o turvamento do meio, que é representativo de

crescimento: positivo (+) quando apresentasse turvamento e negativo (-) quando não apresentasse turvamento.

Foram feitas 5 repetições para cada uma das condições experimentais descritas nas Tabelas a seguir, para cada tipo de microrganismo utilizado na contaminação:

Tabela 4 – Grupos experimentais de posição da amostra

| <b>GRUPO</b> | <b>HORIZONTAL</b> | <b>VERTICAL</b> |
|--------------|-------------------|-----------------|
| H0L1         | Anterior          | nível do prato  |
| H0L2         | Lateral direita   |                 |
| H0L3         | Posterior         |                 |
| H0L4         | Lateral esquerda  |                 |
| H0L5         | Central           |                 |
| H3L1         | Anterior          | 3 cm            |
| H3L2         | Lateral direita   |                 |
| H3L3         | Posterior         |                 |
| H3L4         | Lateral esquerda  |                 |
| H3L5         | Central           |                 |
| H5L1         | Anterior          | 5 cm            |
| H5L2         | Lateral direita   |                 |
| H5L3         | Posterior         |                 |
| H5L4         | Lateral esquerda  |                 |
| H5L5         | Central           |                 |

Tabela 5 – Grupos experimentais de acordo com a presença, tipo e volume do meio de imersão

| <b>GRUPO</b> | <b>MEIO</b> | <b>VOLUME</b> |
|--------------|-------------|---------------|
| A            | nenhum      | nenhum        |
| B1           | água        | 2 ml          |
| B2           | água        | 10 ml         |
| C1           | óleo        | 2 ml          |
| C2           | óleo        | 10 ml         |

Tabela 6 – Grupos experimentais: capacidade do forno, potência e quantidade de fresas

| <b>GRUPO</b> | <b>FORNO</b> | <b>POTÊNCIA (W)</b> | <b>FRESAS</b> |
|--------------|--------------|---------------------|---------------|
| F1P1Q1       | 27 l         | 399,10              | 1             |
| F1P1Q2       | 27 l         | 399,10              | 5             |
| F1P1Q3       | 27 l         | 399,10              | 10            |
| F1P2Q1       | 27 l         | 608,52              | 1             |
| F1P2Q2       | 27 l         | 608,52              | 5             |
| F1P2Q3       | 27 l         | 608,52              | 10            |
| F2P1Q1       | 38 l         | 384,20              | 1             |
| F2P1Q2       | 38 l         | 384,20              | 5             |
| F2P1Q3       | 38 l         | 384,20              | 10            |
| F2P2Q1       | 38 l         | 612,39              | 1             |
| F2P2Q2       | 38 l         | 612,39              | 5             |
| F2P2Q3       | 38 l         | 612,39              | 10            |

**Resultado**

# Resultado

## 1 O efeito da posição da amostra

Nas Tabelas a seguir, podem ser observados os resultados encontrados para a comparação do tempo de exposição necessário para a eliminação de *B. subtilis* (Tabela 7), *E. coli* (Tabela 8) e *C. albicans* (Tabela 9), quando a amostra foi situada em diferentes posições dentro do forno de micro-ondas.

Na primeira coluna são apresentados os tempos de exposição máximos nos quais, em todas as amostras, os microrganismos sobreviveram. Nas colunas intermediárias podem ser visualizados os períodos de exposição nos quais, em algumas amostras, ocorreu a eliminação dos microrganismos, enquanto em outras os mesmos sobreviveram. Os resultados encontrados nos períodos de exposição intermediários foram utilizados para a avaliação da influência da posição da amostra, sobre a capacidade esterilizante das micro-ondas. A última coluna representa o tempo de exposição necessário para a eliminação dos microrganismos, em todas as repetições. Na análise dessas Tabelas, pode-se verificar que o tempo de exposição necessário para a eliminação de *B. subtilis* (Tabela 7) é superior àquele registrado para a eliminação de *E. coli* (Tabela 8) e *C. albicans* (Tabela 9).

Tabela 7 – *B. subtilis*: crescimento após irradiação por micro-ondas. (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento

| POSIÇÃO | Tempo de exposição (min) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|         | 5                        |    |    |    |    | 6  |    |    |    |    | 7  |    |    |    |    | 8  |    |    |    |    |
|         | R1                       | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| H0L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |

Tabela 8 – *E. coli*: crescimento após irradiação por micro-ondas. (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento

| POSIÇÃO | Tempo de exposição (min) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|         | 0,3                      |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    | 2  |    |    |    |    |
|         | R1                       | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| H0L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |



Tabela 9 – *C. albicans*: crescimento após irradiação por micro-ondas. (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento

| POSIÇÃO | Tempo de exposição (min) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|---------|--------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|         | 0,3                      |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    | 2  |    |    |    |    |
|         | R1                       | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
| H0L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H0L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H3L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L1    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L2    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L3    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L4    | +                        | +  | +  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| H5L5    | +                        | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |

Os resultados de sobrevivência microbiana, nos períodos intermediários de exposição, foram agrupados e submetidos à análise estatística pelo método não-paramétrico de Kruskal–Wallis e, em seguida, pelo teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). Os resultados estão expressos nas tabelas que seguem. Ao nível do prato giratório ( $p = 0,0051$ ), L5 foi a posição menos eficiente para a esterilização (Tabela 10). A 3 cm acima do prato giratório ( $p = 0,027$ ), houve diferença estatisticamente significativa apenas entre as posições L3 e L5, sendo que esta última resultou pior (Tabela 11). Quando a amostra foi posicionada a 5 cm acima do prato giratório, nenhuma diferença foi encontrada entre a disposição horizontal da amostra ( $p = 0,3719$ ).

Tabela 10 – Teste de Dunn para valores de sobrevivência microbiana, quando a amostra foi posicionada ao nível do prato giratório

| Comparações | Dif. Postos | z calculado | z crítico | $p$      |
|-------------|-------------|-------------|-----------|----------|
| L1 X L2     | 2,5         | 0,3141      | 2,807     | Ns       |
| L1 X L3     | 2,5         | 0,3141      | 2,807     | Ns       |
| L1 X L4     | 0           | 0           | 2,807     | Ns       |
| L1 X L5     | 22,5        | 2,8273      | 2,807     | $< 0,05$ |
| L2 X L3     | 0           | 0           | 2,807     | Ns       |
| L2 X L4     | 2,5         | 0,3141      | 2,807     | Ns       |
| L2 X L5     | 25          | 3,1414      | 2,807     | $< 0,05$ |
| L3 X L4     | 2,5         | 0,3141      | 2,807     | Ns       |
| L3 X L5     | 25          | 3,1414      | 2,807     | $< 0,05$ |
| L4 X L5     | 22,5        | 2,8273      | 2,807     | $< 0,05$ |

Tabela 11 – Teste de Dunn para valores de sobrevivência microbiana, quando a amostra foi posicionada 3 cm acima do prato giratório

| Comparações | Dif. Postos | Z calculado | z crítico | <i>p</i> |
|-------------|-------------|-------------|-----------|----------|
| L1 X L2     | 10          | 1,2566      | 2,807     | Ns       |
| L1 X L3     | 12,5        | 1,5707      | 2,807     | Ns       |
| L1 X L4     | 0           | 0           | 2,807     | Ns       |
| L1 X L5     | 10          | 1,2566      | 2,807     | Ns       |
| L2 X L3     | 2,5         | 0,3141      | 2,807     | Ns       |
| L2 X L4     | 10          | 1,2566      | 2,807     | Ns       |
| L2 X L5     | 20          | 2,5131      | 2,807     | Ns       |
| L3 X L4     | 12,5        | 1,5707      | 2,807     | Ns       |
| L3 X L5     | 22,5        | 2,8273      | 2,807     | < 0,05   |
| L4 X L5     | 10          | 1,2566      | 2,807     | Ns       |

A comparação entre as alturas (Tabela 12) mostrou uma diferença entre a altura a 5 cm acima do prato giratório e as demais alturas, sendo a primeira pior do que as demais.

Tabela 12 – Comparação entre as três alturas. Teste de Dunn para valores de sobrevivência microbiana, quando a amostra foi posicionada a 3 cm ou a 5 cm acima do prato giratório

| Grupos  | Dif. Postos | z calculado | z crítico | <i>p</i> |
|---------|-------------|-------------|-----------|----------|
| H0 X H3 | 12          | 1,1289      | 2,394     | Ns       |
| H0 X H5 | 43,5        | 4,0921      | 2,394     | < 0,05   |
| H3 X H5 | 31,5        | 2,9633      | 2,394     | < 0,05   |

A comparação isolada entre a disposição horizontal das amostras (Tabela 13) demonstra que o posicionamento da amostra centralmente, sobre o prato giratório (L5), proporciona resultados diferentes e inferiores das posições L1, L2 e L3.

Tabela 13 – Teste de Dunn para comparação entre o posicionamento horizontal das amostras

| Comparações | Dif. Postos | z calculado | Z crítico | p      |
|-------------|-------------|-------------|-----------|--------|
| L1 X L2     | 15          | 1,093       | 2,807     | Ns     |
| L1 X L3     | 20          | 1,4574      | 2,807     | Ns     |
| L1 X L4     | 2,5         | 0,1822      | 2,807     | Ns     |
| L1 X L5     | 40          | 2,9147      | 2,807     | < 0,05 |
| L2 X L3     | 5           | 0,3643      | 2,807     | Ns     |
| L2 X L4     | 17,5        | 1,2752      | 2,807     | Ns     |
| L2 X L5     | 55          | 4,0077      | 2,807     | < 0,05 |
| L3 X L4     | 22,5        | 1,6395      | 2,807     | Ns     |
| L3 X L5     | 60          | 4,3721      | 2,807     | < 0,05 |
| L4 X L5     | 37,5        | 2,7325      | 2,807     | Ns     |

## 2 O efeito do meio de imersão

Os resultados do efeito do tipo e volume de líquido, em contato com a fresa durante a irradiação, estão nas Tabelas 14 e 15.

As fresas irradiadas sem nenhum líquido de imersão, ou contaminadas por *B. subtilis* imersas em óleo, não foram esterilizadas até o período máximo de exposição avaliado (20 min) (Tabelas 14 e 15). Foram necessários 4 min de exposição para a esterilização de fresas contaminadas por *B. subtilis*, imersas em 10 ml água, e 17 min em um volume menor (Tabela 14). *E. coli* ou *C. albicans* (Tabela 15) foram eliminados das fresas quando imersas em água, depois de 1 min ou 2 min (10 ml ou 2 ml respectivamente). A utilização de óleo como meio de imersão foi eficiente na esterilização das fresas contaminadas por *E. coli* ou *C. albicans*, quando utilizado apenas 2 ml (depois de 9 min), pois as fresas imersas em 10 ml não foram esterilizadas até o período máximo de exposição avaliado (20 min).

Tabela 14 – Sobrevida de *B. subtilis* após a irradiação por micro-ondas. (+) foi observado crescimento; (-) não foi observado crescimento

| Tempo de exposição (min) | A seco | Água |       | Óleo |       |
|--------------------------|--------|------|-------|------|-------|
|                          |        | 2 ml | 10 ml | 2 ml | 10 ml |
| 1                        | +      | +    | +     | +    | +     |
| 2                        | +      | +    | +     | +    | +     |
| 3                        | +      | +    | +     | +    | +     |
| 4                        | +      | +    | -     | +    | +     |
| 8                        | +      | +    |       | +    | +     |
| 9                        | +      | +    |       | +    | +     |
| 16                       | +      | +    |       | +    | +     |
| 17                       | +      | -    |       | +    | +     |
| 20                       | +      |      |       | +    | +     |

Tabela 15 – Sobrevida de *E. coli* e *C. albicans* após a irradiação por micro-ondas. (+) foi observado crescimento; (-) não foi observado crescimento

| Tempo de exposição (min) | A seco | Água |       | Óleo |       |
|--------------------------|--------|------|-------|------|-------|
|                          |        | 2 ml | 10 ml | 2 ml | 10 ml |
| 1                        | +      | +    | -     | +    | +     |
| 2                        | +      | -    |       | +    | +     |
| 3                        | +      |      |       | +    | +     |
| 4                        | +      |      |       | +    | +     |
| 8                        | +      |      |       | +    | +     |
| 9                        | +      |      |       | -    | +     |
| 16                       | +      |      |       |      | +     |
| 17                       | +      |      |       |      | +     |
| 20                       | +      |      |       |      | +     |

### 3 Efeito da quantidade de instrumentos, potência e tamanho da cavidade do forno

As Tabelas 16, 17 e 18, a seguir, demonstram os efeitos inibitórios da radiação de micro-ondas, em cada microrganismo utilizado para a contaminação de diferentes quantidades de fresas submetidas a diferentes níveis de potência, em fornos de duas dimensões diferentes.

O tempo de exposição necessário para a eliminação de *B. subtilis* (tempo mínimo de 5 min) foi maior do que para a eliminação de *E. coli* (tempo mínimo de 2 min) e *C. albicans* (tempo mínimo de 1 min).

A quantidade de fresas irradiadas ao mesmo tempo pode necessitar de diferentes períodos de exposição para que sejam esterilizadas, dependendo do microrganismo utilizado na contaminação. Quando as fresas foram contaminadas por *B. subtilis*, o tempo de exposição necessário para a esterilização aumentou de maneira diretamente proporcional à quantidade de fresas (Tabela 16). Para eliminar *C. albicans* foi necessário um minuto adicional, quando se alterou a quantidade de fresas de 5 para 10 (Tabela 18), mas para esterilizar *E. coli* a quantidade de fresas não interferiu no tempo de exposição necessário para a esterilização (Tabela 17).

O nível de potência influenciou todas as condições estudadas (Tabelas 16, 17 e 18). Foram necessários períodos de exposição maiores, quando se utilizaram níveis de potência menores, independentemente do microrganismo utilizado para a contaminação.

Tempos de exposição semelhantes foram necessários para a esterilização de fresas *carbide* nos dois fornos, apesar de terem ocorrido pequenas discrepâncias, que podem ser verificadas nas Tabelas 16 e 18. Para a eliminação de *B. subtilis* foi necessário 1 minuto a mais, quando utilizado o forno de 38 litros, para a esterilização de uma fresa, independentemente da potência empregada (F2P1Q1 ou F2P2Q1), comparando-se com a mesma condição, no forno de 27 litros (F1P1Q1 ou F2P2Q1) (Tabela 16). Foi necessário 1 minuto adicional, para eliminar *C. albicans* de 1 fresa submetida à irradiação no forno de 27 litros, quando comparado com a mesma condição no forno maior (F1P1Q1 e F2P1Q1) (Tabela 18).

Tabela 16 – Sobrevida de *B. subtilis* após irradiação de fresas carbóe. (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento

| Quant. de fresas | Potência | Forno | Tempo de exposição (min) |   |   |   |     |    |    |    |      |   |   |   |
|------------------|----------|-------|--------------------------|---|---|---|-----|----|----|----|------|---|---|---|
|                  |          |       | 4                        | 5 | 6 | 8 | 9,5 | 10 | 11 | 13 | 14,5 |   |   |   |
| Q1               | P1       | F1    | +                        | + | + | + | +   | +  | -  | -  | -    | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | + | +   | +  | +  | -  | -    | - | - | - |
|                  | P2       | F1    | +                        | - | - | - | -   | -  | -  | -  | -    | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | - | - | -   | -  | -  | -  | -    | - | - | - |
| Q2               | P1       | F1    | +                        | + | + | + | +   | +  | +  | +  | -    | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | + | +   | +  | +  | +  | -    | - | - | - |
|                  | P2       | F1    | +                        | + | + | + | -   | -  | -  | -  | -    | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | + | -   | -  | -  | -  | -    | - | - | - |
| Q3               | P1       | F1    | +                        | + | + | + | +   | +  | +  | +  | +    | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | + | +   | +  | +  | +  | +    | - | - | - |
|                  | P2       | F1    | +                        | + | + | + | +   | -  | -  | -  | -    | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | + | +   | -  | -  | -  | -    | - | - | - |

Tabela 17 – Sobrevida de *E. coli* após irradiação de fresas carbíde. (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento

| Quant. de fresas | Potência | Forno | Tempo de exposição (min) |   |   |   |
|------------------|----------|-------|--------------------------|---|---|---|
|                  |          |       | 1                        | 2 | 3 | 4 |
| Q1               | P1       | F1    | +                        | + | + | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | - |
|                  | P2       | F1    | +                        | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | - | - | - |
| Q2               | P1       | F1    | +                        | + | + | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | - |
|                  | P2       | F1    | +                        | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | - | - | - |
| Q3               | P1       | F1    | +                        | + | + | - |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | - |
|                  | P2       | F1    | +                        | - | - | - |
|                  |          | F2    | +                        | - | - | - |



Tabela 18 – Sobrevida de *C. albicans* após irradiação de fresas carbide. (+) houve crescimento; (-) não houve crescimento

| Quant. de fresas | Potência | Forno | Tempo de exposição (min) |   |   |   |   |   |
|------------------|----------|-------|--------------------------|---|---|---|---|---|
|                  |          |       | 0,5                      | 1 | 2 | 3 | 4 |   |
| Q1               | P1       | F1    | +                        | + | + | - | - |   |
|                  |          | F2    | +                        | + | - | - | - |   |
|                  | P2       | F1    | +                        | - | - | - | - |   |
|                  |          | F2    | +                        | - | - | - | - |   |
|                  | Q2       | P1    | F1                       | + | + | + | + | - |
|                  |          |       | F2                       | + | + | + | + | - |
| P2               |          | F1    | +                        | + | - | - | - |   |
|                  |          | F2    | +                        | + | - | - | - |   |
| Q3               | P1       | F1    | +                        | + | + | + | - |   |
|                  |          | F2    | +                        | + | + | + | - |   |
|                  | P2       | F1    | +                        | + | - | - | - |   |
|                  |          | F2    | +                        | + | - | - | - |   |

**Discussão**

## Discussão

### 1 O efeito da posição da amostra

A maior preocupação, quanto ao uso das micro-ondas para a esterilização, diz respeito à distribuição não uniforme da energia dentro da cavidade do forno<sup>7-9,12,13,17-20,29</sup>. Rohrer, Bulard<sup>20</sup>, desde 1985, já haviam demonstrado, por meio do uso de um papel sensível ao calor, a presença de pontos quentes (*hot spots*) e pontos frios (*cold spots*) distribuídos de maneira tridimensional e desigual dentro da cavidade do forno. Kwan-Hoong<sup>13</sup> (1991) usou uma tinta termográfica reversível, para determinar a distribuição espacial relativa da mudança de temperatura dentro da cavidade de um forno de micro-ondas doméstico e, da mesma forma, confirmou a irregularidade da distribuição da energia, demonstrando, também, que a presença de um béquer contendo água, dentro da cavidade do forno, favorece uma distribuição muito mais uniforme. Por esse motivo, um béquer contendo 1 litro de água foi utilizado durante os experimentos do presente estudo, e sempre deve ser usado nos procedimentos de esterilização com fornos de micro-ondas<sup>3,13,20</sup>.

Os resultados deste estudo demonstraram que a posição da amostra, no interior da cavidade do forno, interfere na ação letal das micro-ondas. Tais resultados demonstraram que o posicionamento central (L5) da amostra revelou-se como o menos eficiente à esterilização, em comparação com as demais posições, quer a amostra esteja ao nível do prato giratório ou a 3 cm de altura. Esses resultados poderiam ser justificados pelo seguinte fato: se a amostra estiver localizada nas posições mais marginais do prato giratório (L1, L2, L3 e L4), esta percorre uma distância maior da cavidade do forno, durante a irradiação, com maiores possibilidades de entrar em contato com os pontos quentes. Porém, se a amostra estiver localizada no centro do prato giratório,

apresenta movimento de rotação em torno do seu próprio eixo, diminuindo tal probabilidade.

Pedreño-Molina et al.<sup>17</sup> (2007) verificaram que algumas posições da amostra apresentam melhor padrão de campo elétrico do que outras. Jeng et al.<sup>9</sup> (1987) evidenciaram que, quando a irradiação por micro-ondas é utilizada, a posição da amostra não deve ser negligenciada, baseando-se no fato de os autores terem verificado que pequenas alterações do posicionamento da amostra (1 a 2 cm) podem provocar uma variação de temperatura de 4 a 5°C. Fujikawa et al.<sup>8</sup>, em 1992, demonstraram que quando uma amostra foi situada em posições marginais do prato giratório, o aumento de temperatura foi 93% maior do que quando a amostra foi posicionada no centro do mesmo. Vollmer<sup>29</sup> (2004) verificou que o centro da cavidade do forno proporciona o pior grau de aquecimento da amostra, mesmo se for dispensada a utilização o prato giratório, e reafirmou a importância do emprego deste dispositivo para o favorecimento do contato da amostra com os pontos quentes distribuídos dentro da cavidade do forno. Os resultados do presente estudo também revelaram que a altura da amostra exerce grande influência no resultado da esterilização em fornos de micro-ondas domésticos. Kwan-Hoong<sup>13</sup> (1991) verificou que existem variações verticais da distribuição do campo elétrico dentro da cavidade do forno, e Rohrer, Bulard<sup>20</sup> (1985) já haviam afirmado que a utilização do prato giratório não era suficiente para assegurar que toda a superfície da amostra fosse adequadamente exposta às micro-ondas, sugerindo o uso de um dispositivo que permitia a movimentação tridimensional da amostra durante a irradiação. Outros estudos também propuseram diferentes tipos de dispositivos para favorecer o contato e a absorção das micro-ondas por parte da amostra<sup>7,12,13,17-19,29</sup>. Porém, este estudo demonstrou que, considerando as três alturas avaliadas, o posicionamento da amostra a 5 cm do prato giratório deve ser evitado. Demonstrou, também, que a esterilização é

obtida após um período de exposição muito mais curto do que aquele obtido pelos métodos convencionais de esterilização.

De acordo com o presente estudo, a posição da amostra influenciou a esterilização por micro-ondas, pois, considerando-se o mesmo tempo de exposição, pôde-se verificar que quando as amostras são posicionadas em determinados locais, elas são esterilizadas, enquanto que em outras posições não o são. Para assegurar a esterilização por micro-ondas, é importante considerar a posição do objeto durante a irradiação, pois pequenos deslocamentos podem representar a falha do método. Apesar dos diferentes padrões de aquecimento de acordo com o posicionamento<sup>8</sup> e ainda da influência da posição sobre o tempo necessário para a esterilização, constatada neste estudo, é importante verificar através dos resultados deste estudo que é possível a obtenção da esterilização da amostra em qualquer posição dentro do forno de micro-ondas doméstico após irradiação por períodos muito inferiores ao necessário pelos métodos convencionais de esterilização (estufa, autoclave e imersão em soluções químicas).

A posição central deve ser evitada para a aplicação de métodos de esterilização por micro-ondas, mas deve ser utilizada em estudos científicos como um indicador da eficiência da esterilização, pelo seguinte motivo: quando uma amostra localizada no centro da cavidade do forno é esterilizada, pode-se inferir que a mesma também o seria, se estivesse situada em qualquer outra posição.

## **2 O efeito do meio de imersão**

Sobre as condições experimentais do estudo, os resultados indicaram que a presença de um líquido umectante é fundamental para promover a esterilização de fresas *carbide* por micro-ondas, tendo em vista que quando as fresas foram irradiadas a seco, estas não foram esterilizadas, mesmo após 20 min de exposição às micro-ondas. Tal resultado está de acordo com Vela, Wu<sup>28</sup> (1979), Jeng et al.<sup>9</sup> (1987), que

afirmaram a ocorrência de um efeito muito pequeno sobre microrganismos no estado seco. Contudo, os microrganismos possuem capacidade de absorver a energia de micro-ondas e possuem propriedades térmicas que estão diretamente envolvidas com a destruição microbiana<sup>35</sup>.

Diversos estudos revelaram a importância da água<sup>21,27-28</sup> e de outros materiais sobre os efeitos letais<sup>5,6,8,24,26,30-31</sup> ou simplesmente sobre o aquecimento por meio da energia de micro-ondas<sup>2,7,10-12,18-19</sup>.

Segundo Tanaka et al.<sup>25</sup> (1998), os microrganismos são mortos pelo calor gerado pelas micro-ondas. Contudo, efeitos não térmicos das micro-ondas têm sido sugeridos<sup>35,37</sup>. Watanabe et al.<sup>31</sup> explicou que o calor gerado pelas micro-ondas é função da interação da onda eletro-magnética com o dipolo elétrico da molécula, pois, quando o campo elétrico é aplicado, as moléculas que possuem momento de dipolo elétrico tendem a se alinhar com o campo e, quando o campo é removido, as moléculas tendem a voltar ao seu estado anterior, dissipando energia na forma de calor. Características físicas do material como a forma, a massa, o volume, o fator de perda dielétrica, o calor específico, a condutividade térmica e a densidade<sup>2,4,7,8,12,18</sup> determinam sua capacidade de absorver a radiação de micro-ondas, o que influencia no aquecimento e na esterilização.

Alguns estudos foram desenvolvidos para determinar qual deve ser o melhor líquido de imersão para se esterilizar materiais por micro-ondas. Tarantino et al.<sup>26</sup> (1997) verificaram que quando espelhos bucais eram submergidos em uma solução à base de aldeído, a esterilização por micro-ondas era obtida depois de 4 min de irradiação, ao passo que, quando em solução salina (NaCl 0,9%), os microrganismos sobreviviam. Fujikawa et al.<sup>8</sup> (1992), Wang et al.<sup>30</sup> (2003) comprovaram que a redução da concentração de sal de uma solução de imersão, favorece a destruição bacteriana por micro-ondas. A presença de íons em solução também influencia a resistência bacteriana à irradiação de micro-ondas, segundo Watanabe et al.<sup>31</sup> (2000), Benjamin III et al.<sup>5</sup> (2007).

Estes verificaram que o tempo de exposição necessário para a inativação microbiana na presença de íons foi menor, quando comparado ao controle em água. Finalmente, Takashima et al.<sup>24</sup> (2006) utilizaram um material catalisador (placa metálica de  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$  impregnada com Pt ou Ag) para obter a esterilização, considerando que esta placa ocasiona a esterilização devido à liberação de radicais hidroxilas.

A composição e outras características dos materiais têm sido estudadas. De acordo com Yeo et al.<sup>35</sup> (1999), a densidade afeta o aumento médio de temperatura do material, promovido pelas micro-ondas. Wang et al.<sup>30</sup> (2003) analisaram a influência da viscosidade do líquido sobre a ação letal das micro-ondas e verificaram que as bactérias têm menor resistência às micro-ondas em meios de cultura contendo menos do que 0,8% amido em solução (soluções mais fluidas).

Os dois meios de imersão avaliados (óleo mineral e água destilada) proporcionaram resultados bastante diferentes para a esterilização das fresas *carbide*. A água mostrou-se extremamente superior ao óleo na eliminação dos microrganismos utilizando-se a energia de micro-ondas. Basak<sup>4</sup> (2004), em uma análise detalhada da absorção da energia de micro-ondas, ilustrou que a água absorve fortemente a radiação na faixa de micro-ondas, devido à grande capacidade de perda dielétrica da água. O óleo, por sua vez, em função de sua composição predominantemente apolar, apresenta taxa de aquecimento relativamente baixa. A grande capacidade de absorção da água poderia justificar a maior ação letal das micro-ondas, quando aplicadas às amostras imersas em água. Segundo Barringer et al.<sup>3</sup> (1994), para amostras pequenas (de 20 a 300 g), a diferença de absorção da energia entre o óleo e a água é determinada pelas características dielétricas das amostras. O óleo possui uma taxa de penetração de 36.8 cm, o que significa que uma pequena porcentagem das ondas eletromagnéticas atravessa toda a amostra e uma pequena porcentagem da energia é absorvida (3%). Com uma taxa de penetração de 3.6 cm, em

pequenas amostras de água grande parte das ondas atinge toda a amostra, fazendo com que 64% da energia seja refletida, formando novas ondas que poderão novamente atingir a amostra, enquanto que as amostras maiores absorvem a maior quantidade de energia eletromagnética disponível<sup>3</sup>.

Estudos que testaram água, álcool<sup>11</sup> ou suspensão bacteriana<sup>1,28</sup>, demonstraram que o aumento do volume líquido exacerba o aquecimento e os efeitos letais das micro-ondas. Barringer et al.<sup>3</sup> (1994), ao compararem água e óleo, verificaram a existência de uma correlação entre o volume e a velocidade de aquecimento, ao observarem que em amostras menores do que 100 g, a água aquece mais rapidamente do que o óleo, porém, em amostras maiores do que o valor acima citado ocorre o inverso.

Além da conhecida ação da água sobre a desnaturação de proteínas, o aquecimento mais rápido da água, em relação ao óleo, poderia justificar, ainda que parcialmente, os resultados do presente estudo, os quais demonstraram que o volume de água e de óleo, utilizados como meio de imersão, promoveu efeitos importantes e antagonistas sobre a esterilização de fresas *carbide* em forno de micro-ondas doméstico. Quando as fresas foram imersas em água, constatou-se que quanto maior o volume, menor veio a ser o tempo de exposição necessário para a esterilização. Considerando que um maior volume de água demora mais tempo para aquecer os resultados deste estudo sugerem a existência de efeitos não térmicos sobre a esterilização por microondas, pois se houvesse somente efeitos térmicos, era esperado que um volume menor de água promovesse esterilização após um período de exposição menor às microondas. Quando as fresas foram imersas em um volume maior de óleo, a capacidade de esterilização das micro-ondas revelou-se nulo. Neste caso, é possível que o calor específico tenha sido o responsável por este efeito, já que o óleo, apesar de sua característica apolar que lhe proporciona baixa capacidade de



absorção da energia eletromagnética, possui calor específico baixo (0,5 cal/g°C), o que lhe confere maior facilidade de aquecimento do que a água (1,0 cal/g°C)<sup>3</sup>.

Esses resultados poderiam ser justificados pela diferença de densidade entre os dois líquidos<sup>35</sup> e/ou por suas propriedades dielétricas<sup>3</sup>. De qualquer maneira, ao contrário do que afirmaram Atmaca et al.<sup>1</sup> (1996), o aumento do volume líquido não é suficiente para garantir um aumento do efeito inibitório da radiação de micro-ondas sobre as bactérias, fazendo-se necessário considerar a relação entre o tipo de líquido utilizado, assim como o seu volume.

### 3 Ação sobre os microrganismos

Os três grupos de microrganismos estudados são representativos de células vegetativas de bactérias gram negativas (*E. coli*) e fungo (*C. albicans*), e de bactérias gram-positivas esporuladas (*B. subtilis*). Ficou claro durante este estudo que, sob as mesmas condições, as células vegetativas necessitam de menos tempo de exposição às micro-ondas do que os esporos, para serem eliminadas. Wu<sup>33</sup>, em 1996, verificou que o tempo necessário para a eliminação de diferentes tipos de bactérias é variável, afirmando que características intrínsecas dos microrganismos estariam relacionadas com o grau de absorção da energia de micro-ondas. Setlow<sup>23</sup> (2006) afirmou que esporos em água são resistentes a temperaturas até 40°C mais altos do que células vegetativas da mesma bactéria. Esta resistência dos esporos ao calor úmido pode ser atribuída ao conteúdo de água no núcleo do esporo, que é muito menor do que no protoplasma de células vegetativas<sup>15,23</sup>. Em 2005, Yaghmaee, Durance<sup>34</sup> afirmaram que a *E. coli* possui maior sensibilidade ao calor, sendo necessárias temperaturas abaixo de 64°C para que esta seja destruída. O mecanismo de destruição dos microrganismos por meio da energia de micro-ondas ainda é bastante controverso<sup>23,33-35</sup>, mas Yeo et al.<sup>35</sup> (1999) verificaram que os

microrganismos expostos às micro-ondas aquecem 51 vezes mais do que a suspensão líquida ao redor deles.

#### **4 Efeito da quantidade de Instrumentos**

A quantidade de fresas submetidas à irradiação ao mesmo tempo representa um importante aspecto a ser considerado em procedimentos de esterilização por micro-ondas, pois o tempo de exposição foi diferente, entre quantidades variáveis de fresas submetidas à irradiação ao mesmo tempo, quando estas foram contaminadas por *B. subtilis* ou *C. albicans*, apesar de não ter ocorrido diferença para a esterilização de 1, 5 ou 10 fresas contaminadas por *E. coli*. É importante observar que apesar de ser necessário maior tempo de exposição para a esterilização de uma maior quantidade de fresas, esse tempo ainda é bastante inferior ao tempo de esterilização necessário por outros meios utilizados rotineiramente (estufa – 2 h, autoclave – 40 min, hipoclorito de sódio – 8 h).

#### **5 Efeito da potência**

A avaliação de diferentes níveis de potência indicou que a utilização de níveis mais baixos requer tempos de exposição mais prolongados para eliminar todos os microrganismos, independentemente da quantidade de instrumentos ou do tamanho do forno. Esses resultados estão de acordo com outros achados da literatura, como os de Youssef, Amin<sup>36</sup> (s/d) e Wang et al.<sup>30</sup> (2003), que irradiaram culturas microbianas, ou Yeo et al.<sup>35</sup> (1999), que submeteram discos metálicos à esterilização por micro-ondas, entre outros<sup>8,32,33,34</sup>. Esses resultados demonstram a importância do uso de um nível de potência apropriado para que a esterilização por micro-ondas seja obtida em determinado tempo de exposição. Apesar desse fato, deve ser observado que em nenhum desses estudos foi mencionado o uso de qualquer cálculo da potência real do forno de micro-ondas. A principal vantagem da utilização de níveis

de potência mais baixos é a redução da possibilidade do superaquecimento da amostra<sup>10</sup>, porém, já foi comprovado que o emprego de um béquer com água (1 l) é suficiente para evitar a ocorrência do superaquecimento<sup>13</sup> e, portanto, é recomendável o uso de níveis de potência mais elevados, para que a esterilização seja obtida em menor tempo.

## 6 Efeito da capacidade do forno

Embora alguns estudos<sup>7,13,19</sup> afirmem que o tamanho da cavidade interna do forno possa interferir na capacidade de esterilização das micro-ondas, esta informação não foi confirmada pelos resultados deste trabalho. Diprose<sup>7</sup> (2001) também não encontrou diferença ao comparar a velocidade de aquecimento de amostras em quatro fornos de micro-ondas diferentes, apesar da afirmação do autor de que cavidades maiores necessitariam da aplicação da radiação em maior frequência para assegurar a mesma distribuição da energia do que em cavidades menores. Esses resultados poderiam ser justificados pela pequena variação de volume entre os fornos de microondas domésticos, que não necessitaria de modificação do nível de frequência.

Quanto maior o tempo de exposição empregado, maior a capacidade letal das micro-ondas, sendo que a esterilização dos instrumentos foi obtida, independentemente do forno empregado ou da quantidade de fresas irradiadas ao mesmo tempo, depois da aplicação de 4 min para *E. coli* e *C. albicans* ou 14,5 min para esporos de *B. subtilis*. Papadopoulou et al.<sup>16</sup> (1995), Yeo et al.<sup>35</sup> (1999) corroboram com este achado, sendo que em seus estudos foi encontrada a mesma correlação inversamente proporcional entre a sobrevivência bacteriana e o tempo de exposição, pois a viabilidade celular foi reduzida devido ao aumento do tempo de exposição. A comparação, nos trabalhos da literatura, entre os tempos de exposição necessários para a eliminação de microrganismos, é complexa, por existirem grandes diferenças entre as metodologias, tais

como: a potência empregada, o aparelho de micro-ondas e os materiais irradiados, entre outros. Sanborn et al.<sup>22</sup> (1982) conseguiram a eliminação de *E. coli* após 2 min de exposição, mas o nível de potência não foi revelado. Rohrer, Bulard<sup>20</sup> (1985) esterilizaram fresas odontológicas depois de 15 min a 720 W (não foi mencionado o método de determinação da potência real). Lâminas de bisturi contaminadas por *B. subtilis* e *E. coli* foram esterilizadas a 600 W, em 3 min, no trabalho de Rosaspina et al.<sup>21</sup> (1994). Latimer, Matsen<sup>14</sup> (1977) não conseguiram esterilizar uma cultura de esporos de *B. subtilis* (5 ml) após 11 min de exposição. Celandroni et al.<sup>6</sup> (2004) compararam os efeitos das micro-ondas (100 W) e do aquecimento convencional, utilizando suspensões de esporos em 0,1% NaCl (0,25 ml), e a completa eliminação dos esporos foi obtida depois de 20 min de exposição. Espelhos bucais foram esterilizados por micro-ondas depois de 4 min (600 W), quando foram imersos em um líquido coadjuvante<sup>26</sup>. Tate et al.<sup>27</sup> (1995) esterilizaram dois tipos de pontas de polimento por micro-ondas (750 W) depois de 6 min, quando imersas em 5 ml de água destilada, e Papadopoulou et al.<sup>16</sup> (1995) eliminaram *E. coli* de um meio de cultura, após 30 segundos de exposição a 650 W.

Os dados apresentados neste estudo revelam que a irradiação em forno de micro-ondas doméstico é um método rápido, prático e efetivo de esterilização de fresas *carbide*, alavancado pelo fato de que esse aparelho apresenta grande disponibilidade comercial e com baixo custo, quando se compara às outras tecnologias (autoclave, radiação UV ou raios  $\gamma$ ). Outros pequenos instrumentos metálicos também poderiam ser esterilizados nas mesmas condições, como por exemplo, grampos, limas endodônticas, pontas diamantadas e instrumentos para implantes. Porém, as condições avaliadas neste estudo, como a quantidade, a forma e o tamanho do instrumento, devem ser considerados para a determinação do tempo de exposição necessário para a esterilização de outros tipos de instrumentos.

**Conclusão**

## Conclusão

De acordo com o presente estudo, pode-se concluir que:

- Disposição espacial da amostra na cavidade do forno (sentidos vertical e horizontal) interfere no tempo de exposição necessário para a esterilização, sendo que a posição central deve ser evitada;
- A presença de um líquido de imersão é imprescindível para a esterilização de fresas *carbide* em fornos de micro-ondas domésticos, sendo mais favorável a imersão em 10 ml de água deionizada;
- Quanto maior o nível de potência aplicado, menor o tempo de exposição necessário para a esterilização;
- Nível de potência, capacidade dos fornos de micro-ondas e quantidade de instrumentos irradiados simultaneamente.
- Quanto maior a quantidade de fresas irradiadas ao mesmo tempo, maior o tempo de exposição necessário para a esterilização;
- A capacidade do forno de micro-ondas doméstico não interferiu no tempo de exposição necessário para a esterilização;
- Existe diferença na resistência dos microrganismos às micro-ondas;
- Podem ser esterilizadas até 10 fresas *carbide* simultaneamente desde que imersas em 10 ml de água deionizada contida em um frasco de vidro com tampa de rosca disposto em qualquer posição sobre o prato giratório de um forno de microondas doméstico de 27 ou 38 l, a aproximadamente 600 W por um período de exposição de 14,5 min.

## Referências

## Referências\*

1. Atmaca S, Akdag Z, Dasdag S, Celik S. Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1996; 43: 371-8.
2. Atwater JE, Michalek WF, Wheeler Jr. RR, Dahl R, Lunsford TD, Garmon FC, Sauer RL. A microwave-powered sterilizable interface for aseptic access to bioreactors those are vulnerable to microbial contamination. *Biotechnol Prog.* 2001; 17: 847-51.
3. Barringer SA, Davis EA, Gordon J, Ayappa KG, Davis HT. Effect of sample size on the microwave heating rate: oil vs. water. *Am Inst Chem Eng J.* 1994; 40: 1433-9.
4. Basak T. Role of resonances on microwave heating of oil-water emulsions. *Am Inst Chem Eng J.* 2004; 50: 2659-75.
5. Benjamin III E, Reznik A, Benjamin E, Williams AL. Mathematical models of cobalt and iron ions catalyzed microwave bacterial deactivation. *Int J Environ Res Public Health.* 2007; 4: 203-10.
6. Celandroni F, Longo I, Tosoratti N, Giannessi F, Ghelardi E, Salvetti S, Baggiani A, Senesi S. Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spore. *J Appl Microbiol.* 2004; 94: 1220-7.
7. Diprose MF. Some considerations when using a microwave oven as a laboratory research tool. *Plant Soil.* 2001; 229: 271–80.
8. Fujikawa H, Ushioda H, Yasuo K. Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 920-4.
9. Jeng DKH, Kaczmarek KA, Woodworth AG, Balasky G. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53: 2133-7.
10. Kelen A, Varsanyi EP, Ress S, Nagy T, Hodi KP. Practical method for choosing diluent that ensures the best temperature uniformity in the case of pharmaceutical microwave vacuum during of a heat sensitive product. *Euro J Pharm Bio.* 2005; 1: 1-9.
11. Kok LP, Visser PE, Boon ME. Programming the microwave oven. *J Neuro Meth.* 1994; 55: 119-24.

---

\* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)



12. Kopyt P, Celuch-Marcysiak M. FDTD modeling and experimental verification of electromagnetic power dissipated in domestic microwave ovens. JTIT. 2003; 1: 59-65.
13. Kwan-Hoong NG. Microwave ovens: mapping the electrical field distribution. Med Lab Sci. 1991; 48: 189-92.
14. Latimer JM, Matsen JM. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 1977; 6: 340-2.
15. Melly E, Genest PC, Gilmore ME, Little S, Popham DL, Driks A, Setlow P. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. J Appl Microbiol. 2002; 92: 1105-15.
16. Papadopoulou C, Demetriou D, Panagiou A, Levidiotou S, Gessouli H, Ionnides K, Antoniadis G. Survival of *Enterobacteria* in liquid cultures during microwave radiation and conventional heating. Microbiol Res. 1995; 150: 305-9.
17. Pedreño-Molina JL, Monzó-Cabrera J, Catalá-Civera JM. Sample movement optimization for uniform heating in microwave heating ovens. International Journal of RF and Microwave Computer-Aided Engineering. 2007; 1: 142-52.
18. Plaza-Gonzalez P, Monzó-Cabrera J, Catlá-Civera JM. Effect of mode-stirrer configurations on dielectric heating performance in multimode microwave applicators. IEEE T Microw Theory. 2005; 53: 1699-706.
19. Requena-Pérez M, Pedreño-Molina JL, Monzó-Cabrera J, Díaz-Morcillo A. Multimode cavity efficiency optimization by optimum load location – Experimental approach. IEEE T Microw Theory. 2005; 53: 2114-2120.
20. Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization. J Am Dent Assoc. 1985; 110: 194-8.
21. Rosaspina S, Liguori G, Anzanel D, Finzi G, Salvatorelli G. Prove sperimentali su di um sistema di sterilizzazione a micro-onde. Minerva Stomatol. 1994; 43: 17-21.

22. Sanborn MR, Wan SK, Bulard R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 44: 960-4.
23. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* 2006; 101: 514-25.
24. Takashima H, Miyakawa Y, Kanno Y. Microwave sterilization with metal thin film coated catalyst in liquid phase. *Mater Sci Eng C.* 2007; 27: 898-903.
25. Tanaka Y, Fujikawa S, Kataoka D, Takagaki T, Takano S, Honda S, Katayose M, Kinoshita Y, Toyoshima Y. Warming and sterilizing towels by microwave irradiation. *Yonago Acta Med.* 1998; 41: 83-8.
26. Tarantino L, Tomassini E, Petti S, D' Arca AS. L'impiego di un apparecchio a microonde nella sterilizzazione di strumentario odontoiatrico: possibilità e limiti. *Minerva Stomatol.* 1997; 46: 561-6.
27. Tate WH, Goldschmidt M, Ward M, Grant RL. Disinfection and sterilization of composite polishing instruments. *Am J Dent.* 1995; 8: 270-2.
28. Vela GR, Wu JF. Mechanism of lethal action of 2,450-MHz radiation on microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 1979; 37: 550-3.
29. Vollmer, M. Physics of the microwave oven. *Phys Educ.* 2004; 39: 74-81.
30. Wang JC, Hu SH, Lin CY. Lethal effect of microwaves on spores of *Bacillus spp.* *J Food Protect.* 2003; 66: 604-9.
31. Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, Miake F, Tsukiji T. Effect of ionic strength on the inactivation of micro-organisms by microwave irradiation. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31: 52-6.
32. Webb BC, Thomas CJ, Harty DWS, Willcox MDP. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 416-23.
33. Wu Q. Effect of high-power microwave on indicator bacteria for sterilization. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1996; 43: 752-4.
34. Yaghmaee P, Durance TD. Destruction and injury of *Escherichia coli* during microwave heating under vacuum. *J Appl Microbiol.* 2005; 98: 498–506.

35. Yeo CBA, Watson IA, Stewart-Tull DES, Koh VHH. Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation. J Appl Microbiol. 1999; 87: 396-401.
36. Youssef EMA, Amin GA. Microwave sterilization of tissue culture media. Isht Acta Horticulturae 560: IV International Symposium On In Vitro Culture And Horticultural Breeding. s/d.
37. Zhang H, Data AK, Taub IA, Doona C. Electromagnetics, heat transfer, and thermokinetics in microwave sterilization. AIChE J. 2001; 47: 1957-68.

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 14 de julho de 2009.

ANA PAULA GONÇALVES PITA