

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

PAULO MAURÍCIO BATISTA DA SILVA

Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C.*
albicans em resinas acrílicas termopolimerizáveis

Bauru

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO MAURÍCIO BATISTA DA SILVA

Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

Bauru
2009

Si38e Silva, Paulo Maurício Batista da
Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis / Paulo Maurício Batista da Silva. - Bauru, 2009.
140 p.:il.; 31cm.

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Dedicatória

Aos meus pais, Adelino e Valda, meus eternos e maiores incentivadores. Ao meu Pai, por uma lição de vida de profissionalismo e dedicação não só para mim, mas para todos que tiveram o privilégio de sua companhia. À minha Mãe, por todo seu imenso amor e estímulo em todos os momentos da minha vida. E a ambos pela abdicção dos seus sonhos para que os meus pudessem ser realizados, porém hoje acho que consegui realizar um sonho em comum. Sem vocês, eu não conseguiria concretizar a metade dos meus sonhos e ambições. Sem vocês, esse momento seria simplesmente impossível!

Aos Meus irmãos, André e Cláudia, pelo carinho, confiança e apoio que sempre me foram concedidos em até hoje.

Aos meus sobrinhos, Fernanda, Felipe e Bia, por me oferecerem momentos de imensa alegria sempre que estamos juntos.

À Patrícia Calderon, por contribuir diretamente com sua inteligência e objetividade na concretização desta pesquisa, e, principalmente, por me proporcionar diariamente amor, amizade e confiança.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, pela confiança em meu trabalho e paciência com meus tropeços; pela prontidão em me atender e entusiasmo em me ensinar; pela tranqüilidade que transmitiu nos momentos de ansiedade encontrados na pesquisa e pelo papel importante que assumiu nesta jornada.

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio, por todas as vezes que interrompeu suas atividades e respondeu minhas dúvidas, fazendo com que, deste modo, eu adquirisse conhecimentos na área de Microbiologia, até então quase desconhecida por mim.

Aos também diretos colaboradores deste trabalho, Marcelo Milanda e Márcia Graef, pela competência, companheirismo, ajuda e conhecimentos compartilhados.

Agradecimentos

Aos colegas de Mestrado, Ana Carolina Morandini, Cintia Lumi, Daniel Hiramatsu, David Garcia, Fábio Lorenzoni, Fábio Xang, Felipe Ferreira, Gustavo Pimentel, José Luiz Goés, João Paulo Cenizo, Marcelo Ramos, Marcos Rodrigues, Oswaldo Alarcon, Priscila Hildenberg e Rosalyn, pela companhia quase diária, pelas trocas de experiência e amizade.

À Aline Dantas, que através de seu jeito cativante, alegre, espontâneo e carinhoso, se tornou digna da minha amizade e do meu mais profundo respeito. Tenho certeza que nossa amizade é especial e se estenderá além dos muros da FOB.

Aos colegas do Doutorado em Reabilitação Oral, Murilo Auller, Eduardo Meira, Romão Mansano, Jefferson Buda, Thiago Pegoraro, Renata, Eduardo Figueira, Pedro Acoesta, Leandro Martins, Andréia Joaquim e Márcio Taga, pela amizade e valiosa ajuda durante o mestrado.

Aos colegas de linha de pesquisa, Luciana Rezende, Flora Távora e Matheus Jacobina, pela ajuda em momentos essenciais, conversas e sugestões que foram fundamentais durante a realização deste trabalho. Em especial, ao Emílio Rodriguez, grande companheiro, que me ajudou ativamente neste projeto, fazendo com que este trabalho se tornasse menos árduo.

Aos colegas de outras áreas de Pós-graduação da FOB, Luciana Mendonça e Ricardo Vigolino, pela ajuda e momentos de descontração, e, também, à Thaís Gasparotto e a Ronald Ordinola, pelos pertinentes e relevantes conselhos sobre a metodologia desta pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, representada por seu Diretor Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, e à sua Comissão de Pós-Graduação, representada pela Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Aos Professores do Departamento de Prótese, Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, Prof. Dr. Carlos Dos Reis Pereira de Araújo, Prof. Dr. Gerson Bonfante, Prof. Dr. José Henrique Rubo, Profa. Dra. Lucimar Falavinha, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, Prof. Dr. Milton Carlos Salvador, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti, Prof. Dr. Paulo Martins Ferreira, Prof. Dr. Pedro César Garcia e Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela e, pelos seus ensinamentos enriquecedores.

Ao Prof. Dr. Rumio Taga, pelo empréstimo do tetróxido de ósmio, útil na análise dos corpos-de-prova no MEV.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris pela colaboração na análise estatística deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Prótese Dentária, Marcelo Giatti, Reivanildo, Walquíria, Cláudia e Débora, pela solicitude e disponibilidade.

À funcionária do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), Dona Neusa, pela paciência e prestatividade.

À funcionária da Clínica de Pós-graduação, Hebe, por seu bom humor e carinho com todos os pós-graduandos.

Ao funcionário do Departamento de Endodontia, Edimauro de Andrade, pela importante ajuda na aquisição das imagens no MEV.

À ACECIL, pela colaboração na esterilização dos corpos-de-prova utilizados nesta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido, fundamental para conclusão deste curso.

RESUMO

As soluções desinfetantes têm sido empregadas como um dos principais métodos no controle de biofilmes microbianos, tais como os formados sobre a superfície de próteses totais. O objetivo desta pesquisa foi analisar o efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resina acrílica termopolimerizável, por meio de microscopia confocal de varredura a laser, de cultura microbiológica e de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sessenta corpos-de-prova (5 x 5 x 1 mm) foram confeccionados, esterilizados e inoculados individualmente com *C. albicans* (1.10^7 cel/mL), aguardando-se 24 horas a 37°C para a formação do biofilme. A seguir, 24 corpos-de-prova foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=6), de acordo com as soluções testadas: G1 (controle) – água destilada por 10 minutos; G2 – gluconato de clorexidina a 4% por 10 minutos; G3 – hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos; G4 – hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos. Após a desinfecção, os biofilmes remanescentes sobre os corpos-de-prova foram corados através dos fluorocromos SYTO-9 e iodeto de propídeo para análise no microscópio confocal. Ademais, 24 novos corpos-de-prova foram submetidos ao mesmo processo de desinfecção e destinados à análise através de cultura microbiológica. Após 48 horas de incubação, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Ainda, o mesmo processo de desinfecção foi utilizado para 12 novos corpos-de-prova para análise em MEV. Os dados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste Student-Newman-Keuls, considerando um nível de significância de 5%. Os resultados obtidos pelo microscópio confocal demonstraram que todas as soluções desinfetantes promoveram a morte de todas as células fúngicas remanescentes sobre os corpos-de-prova. Resultado semelhante foi obtido através da análise por meio de cultura microbiológica, pois todas as soluções desinfetantes foram capazes de impedir o crescimento fúngico em cultura. Através da análise em microscópio confocal e em MEV, não foi observada remoção das células do biofilme fúngico sobre os corpos-de-prova pela solução de gluconato de clorexidina a 4%. Por outro lado, as soluções de hipoclorito a 1% e 2% promoveram uma remoção quase completa do biofilme fúngico da superfície dos corpos-de-prova. Além disso, através do MEV, alterações morfológicas foram observadas nas poucas células fúngicas

remanescentes da desinfecção através de hipoclorito de sódio a 1%. Desse modo, a partir das condições experimentais deste estudo, pode-se considerar que as soluções de hipoclorito de sódio a 1% e 2% apresentaram um efeito antimicrobiano superior, quando comparados com a solução de gluconato de clorexidina a 4%.

Palavras-chave: Desinfecção. Prótese Total. Estomatite sob Prótese. Microscopia Confocal. Candida albicans.

ABSTRACT

Antimicrobial effect of disinfectant solutions on *C. albicans* biofilms on heat-polymerized acrylic resins

Disinfectant solutions have been used as one of the principal methods to control microbial biofilms such as those formed on the complete denture surface. The aim of this study was to analyze the antimicrobial effect of disinfectant solutions on *C. albicans* biofilms on heat-polymerized acrylic resin by microbiological culture analysis, confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM). Sixty specimens (5 x 5 x 1 mm) were fabricated, sterilized and individually inoculated with *C. albicans* (1.10^7 cells/mL) during 24 hours at 37°C to allow the biofilm formation. After that, these 24 specimens were randomly divided into 4 groups (n=6) according to the disinfection solutions tested: G1 (control) – distilled water for 10 minutes; G2 – 4% chlorhexidine gluconate for 10 minutes; G3 – 1% sodium hypochlorite for 10 minutes; G4 – 2% sodium hypochlorite for 5 minutes. After disinfection, the remaining biofilms on the specimens were stained with fluorochromes SYTO-9 and propidium iodide to be analyzed by CLSM. Furthermore, the same disinfection process was applied to another 24 specimens which were submitted to microbiological culture analysis. After 48 hours of incubation, quantification of colony-forming units (CFU/mL) was performed. Also, the same disinfection process was applied to the remaining 12 specimens for the SEM analysis. The data were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls tests, considering a significance level of 5%. The data obtained by CLSM revealed that all disinfectant solutions killed all remaining fungal cells on the specimens. Similar results were obtained by microbiological culture analysis, where all disinfectant solutions were able to avoid fungal growth in culture. CLSM and SEM analyses of specimens indicated that the 4% chlorhexidine gluconate solution did not remove the *C. albicans* cells from the resin acrylic surface. On the other hand, the 1% and 2% sodium hypochlorite solutions provided an almost complete biofilm removal from the acrylic surface. Furthermore, by SEM examination, morphologic damages became evident in the few residual *Candida* cells after 1% sodium

hypochlorite disinfection. Thus, such findings suggest that, under the experimental conditions of this study, the 1% and 2% sodium hypochlorite solutions showed superior antimicrobials effect when compared with the 4% chlorhexidine gluconate solution.

Keywords: Disinfection. Complete Dentures. Denture Stomatitis. Confocal Microscopy. *Candida albicans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da formação de biofilme de <i>C. albicans</i> em lâmina de polimetilmetacrilato (PMMA).....	27
Figura 2 –	Confecção dos padrões de silicona.....	49
Figura 3 –	Inclusão dos padrões de silicona em mufla.....	51
Figura 4 –	Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento dos bastões de resina acrílica.....	53
Figura 5 –	Lixamento dos bastões de resina acrílica, avaliação da rugosidade superficial, seccionamento e esterilização dos corpos-de-prova.....	55
Figura 6 –	Microrganismos e condições de crescimento.....	57
Figura 7 –	Formação do biofilme.....	58
Figura 8 –	Desinfecção dos corpos-de-prova.....	60
Figura 9 –	Processamento dos corpos-de-prova para microscopia confocal.....	61
Figura 10 –	Seqüência padrão de análise dos 6 campos dos corpos-de-prova no microscópio confocal.....	61
Figura 11 –	Processamento dos corpos-de-prova para cultura microbiológica.....	64

Figura 12 –	Processamento dos corpos-de-prova para MEV.....	66
Figura 13 –	Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável tratado com água destilada por 10 minutos (grupo controle) através do microscópio confocal....	72
Figura 14 –	Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável tratado com água destilada por 10 minutos (grupo controle) através do MEV.....	72
Figura 15 –	Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de gluconato de clorexidina a 4% por 10 minutos através do microscópio confocal.....	73
Figura 16 –	Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de gluconato de clorexidina a 4% por 10 minutos através do MEV.....	74
Figura 17 –	Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos através do microscópio confocal.....	75
Figura 18 –	Imagens do biofilme de <i>C. albicans</i> sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos através do MEV.....	75

Figura 19 – Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos através do microscópio confocal..... 76

Figura 20 – Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos através do MEV..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos corpos-de-prova de acordo com a solução desinfetante utilizada.....	59
Tabela 2 –	Média e desvio-padrão de células viáveis, não viáveis e total de células remanescentes para os grupos avaliados e número de corpos-de-prova por grupo.....	78
Tabela 3 –	Comparações entre as médias de células viáveis para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.....	79
Tabela 4 –	Comparações entre as médias de células não viáveis para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.....	80
Tabela 5 –	Comparações entre as médias do número total de células remanescentes para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.....	81
Tabela 6 –	Médias e desvio padrão de UFC/mL para os diferentes grupos testados e número de corpos-de-prova por grupo.....	82
Tabela 7 –	Comparações entre as médias de UFC/mL para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- *C. albicans* = *Candida albicans*
- et al = e colaboradores
- μm = micrometro
- mm = milímetros
- % = por cento
- NaOCl = hipoclorito de sódio
- pH = potencial hidrogeniônico
- SH = grupamento sulfidríla
- NH = grupamento amina
- DNA = do inglês “deoxyribonucleic Acid” traduzido como ácido desoxirribonucleico
- ATPase = adenosinase trifosfatase
- mg/L = miligramas por litro
- ATP = adenosina trifosfato
- C = Celsius
- ° = graus
- cm^2 = centímetro quadrado
- MEV = microscopia eletrônica de varredura
- W = watt
- mm^2 = milímetro quadrado
- RAM = redução da atividade metabólica
- $\mu\text{g/mL}$ = micrograma por mililitro
- n = número de corpos-de-prova da amostra
- G = grupos
- *C. glabrata* = *Candida glabrata*
- *C. tropicalis* = *Candida tropicalis*
- mL = mililitro
- *C. kefyr* = *Candida kefyr*
- *C. famata* = *Candida famata*
- rlu = unidade de luminescência relativa –
- cm = centímetro

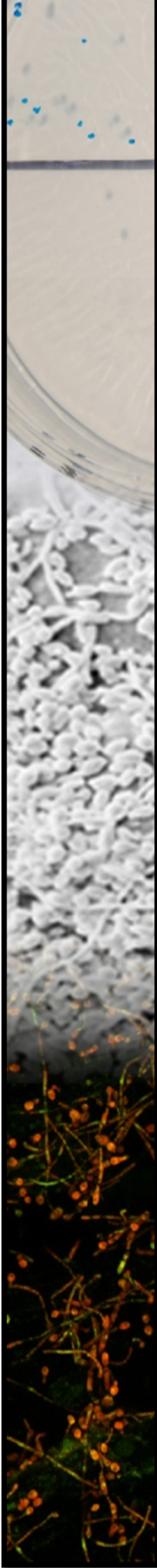
- ATCC = The American Type Culture Collections
- *S. mutans* = *Streptococcus mutans*
- *E. coli* = *Escherichia coli*
- *S. aureus* = *Streptococcus aureus*
- *B. subtilis* = *Bacillus subtilis*
- Cel/mL = célula por mililitro
- UFC = unidade formadora de colônia
- kg = quilograma
- n° = número
- kgf = quilograma-força
- g = gramas
- Ra = unidade de medida de rugosidade superficial
- mm/s = milímetros por segundo
- TSB = do inglês "Tryptic Soy Broth" traduzido como caldo de soja trípico
- PBS = do inglês "phosphate buffer solution" traduzido como solução de tampão fosfato
- rpm = rotações por minuto
- nm = nanometro
- μ M = micromolar
- μ L = microlitro
- NAP/MEPA = Núcleo de Apoio à Pesquisa/ Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária
- p = nível de significância
- ufc/mL = unidades formadoras de colônias por mililitro
- DP = desvio padrão

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 – Estomatite por prótese total.....	23
1.2 – Formação do biofilme sobre prótese total.....	25
1.3 – Controle do biofilme sobre prótese total.....	28
1.3.1 – Hipoclorito de sódio.....	31
1.3.2 – Clorexidina.....	33
1.4 – Técnicas empregadas na análise dos efeitos dos agentes antimicrobianos sobre os biofilmes.....	35
1.5 – Estudos relacionados à eficácia antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina no controle do biofilme sobre próteses totais.....	37
2 – PROPOSIÇÃO.....	43
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 – Confecção dos corpos-de-prova.....	49
3.1.1 – Confecção dos padrões de silicona.....	49
3.1.2 – Inclusão dos padrões de silicona em mufla.....	50
3.1.3 – Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento dos bastões de resina acrílica.....	52
3.1.4 – Lixamento dos bastões de resina acrílica, avaliação da rugosidade superficial, seccionamento e esterilização dos corpos-de-prova.....	54
3.2 – Inoculação dos corpos-de-prova.....	56
3.2.1 – Microrganismos e condições de crescimento.....	56
3.2.2 – Formação do biofilme.....	57

3.3 – Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de <i>C. albicans</i> presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável.....	58
3.3.1 – Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de <i>C. albicans</i> através de microscopia confocal.....	58
3.3.1.1 – Desinfecção dos corpos-de-prova.....	58
3.3.1.2 – Processamento dos corpos-de-prova para microscopia confocal.....	60
3.3.1.3 – Análise dos corpos-de-prova no microscópio confocal.....	61
3.3.2 – Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de <i>C. albicans</i> através de cultura microbiológica.....	62
3.3.2.1 Desinfecção dos corpos-de-prova.....	63
3.3.2.2 – Processamento dos corpos-de-prova para cultura microbiológica.....	63
3.4 – Análise do efeito das soluções desinfetantes sobre as <i>C. albicans</i> presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através do microscópio confocal e do MEV.....	65
3.4.1 – Desinfecção dos corpos-de-prova para análise em MEV.....	65
3.4.2 – Processamento dos corpos-de-prova para MEV.....	65
3.4.3 – Análise dos corpos-de-prova através do MEV.....	66
3.5 – Análise estatística.....	67
4 – RESULTADOS.....	69
4.1 – Análise do efeito das soluções desinfetantes nas <i>C. albicans</i> presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através do microscópio confocal e do MEV.....	71
4.1.1 – Grupo controle.....	71
4.1.2 – Solução de gluconato de clorexidina a 4%.....	73
4.1.3 – Solução de hipoclorito de sódio a 1%.....	74
4.1.4 – Solução de hipoclorito de sódio a 2%.....	76

4.2 – Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de <i>C. albicans</i> presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através do microscópio confocal.....	77
4.3 – Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de <i>C. albicans</i> presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através de cultura microbiológica.....	81
5 – DISCUSSÃO.....	85
5.1 – Da metodologia.....	87
5.2 – Dos resultados.....	92
5.2.1 – Dos resultados obtidos através do microscópio confocal e do MEV.....	92
5.2.2 – Dos resultados obtidos através de cultura microbiológica.....	95
6 – CONCLUSÃO.....	99
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICES.....	117



1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Estomatite por prótese total

A candidose é uma entidade clínica bem conhecida no meio odontológico, sendo Langenback, o primeiro pesquisador a isolar o seu agente em 1839. Trata-se da uma infecção fúngica mais corriqueira na boca, sendo a *Candida albicans* a espécie mais freqüentemente encontrada (WILLIAMS et al., 1997). A *C. albicans* é um fungo dimórfico, que pode se apresentar sob forma de levedura (inócua) ou hifa (patogênica) (BUNETEL e BONNAURE-MALLET, 1996). É comumente notada em pacientes portadores de próteses totais, pacientes imunodeprimidos, que se submeteram a antibioticoterapia ou usuários de medicamentos que induzam à xerostomia (BIRMAN, 2002).

No que tange aos portadores de prótese total, observa-se uma grande ocorrência desta patologia nestes indivíduos, recebendo, nestes casos, a denominação de estomatite por prótese total. A literatura reporta uma grande variedade de terminologias para se referir a esta doença: estomatite por dentadura ou estomatite protética (CROCKETT, O'GRADY e READE, 1992; KULAK-OZKAN, KAZAZOGLU e ARIKAN, 2002), candidíase eritematosa (CROCKETT, O'GRADY e READE, 1992), boca irritada por dentadura (denture sore mouth) (BUDTZ-JORGENSEN, 1978), estomatite por dentadura associada à *Candida* (MAZA et al., 2002), estomatite induzida por dentadura (NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998), candidose oral associada ao uso de dentadura (BUDTZ-JORGENSEN et al., 2000), candidíase atrófica crônica (BUDTZ-JORGENSEN, 1978) e estomatite relacionada à dentadura (BARBEAU et al., 2003). Entretanto, optamos por utilizar o termo estomatite por prótese total por ser o mais utilizado (ARENDORF e WALKER, 1987).

Esta patologia consiste em uma lesão que acomete entre 11% a 60% dos portadores de prótese total maxilar (BUDTZ-JORGENSEN, 1974). Sua presença é mais acentuada em mulheres do que em homens e a freqüência aumenta com a idade (DAVENPORT, 1970). É observada na mucosa palatina que serve de suporte para as próteses totais (WEBB et al., 1998b), sendo rara a sua manifestação no arco

mandibular. Geralmente é assintomática, podendo apresentar sintomatologia rara, como dor, halitose, prurido e queimação (FIGUEIRAL et al., 2007).

A etiologia da estomatite por prótese total mostra-se extremamente variável, conceitualmente classificada como uma doença multifatorial, podendo estar associada à alergia ao monômero residual, ao acúmulo de placa microbiana, à trauma causado pela prótese total, à hipossalivação e à infecção por *C. albicans* (ALLEGRA e GENNARI, 2000). Entre esses fatores, a maioria dos estudos afirma que a *C. albicans* representa o principal agente etiológico para essa patologia (ARENDORF e WALKER, 1987; NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998).

Porém, a ocorrência isolada destes fatores não assegura o surgimento desta infecção, sendo necessária a associação entre estes. Como exemplo, vale ressaltar o estudo de Barbeau et al. (2003) a respeito da controversa relação entre a *Candida sp.* e os traumatismos protéticos, como agentes etiológicos desta patologia. Estes reavaliaram a classificação clássica das estomatites por próteses totais descritas por Newton (1962), a qual se baseia na severidade do eritema na mucosa do palato bucal. Segundo a nova classificação proposta por estes autores, na estomatite por próteses totais do Tipo 1 não há evidências de inflamação da mucosa do palato bucal (sem estomatite), na do Tipo 2 há apenas a presença de petéquias dispersas através de toda ou uma restrita parte da mucosa palatal em contato com a prótese total (Newton 1), na do Tipo 3 há uma difusão do eritema pelo palato, porém sem hiperplasia papilar (Newton 2) e na do tipo 4 há uma difusão do eritema pelo palato com hiperplasia papilar (Newton 3). Como conclusão, os autores afirmaram que no estágio inicial (Tipo 2), a inflamação local causada pela presença da dentadura, não é proveniente de infecções microbianas, pois a quantidade e número de colônias de leveduras e de placa microbiana na dentadura, é baixa. Além disso, estes autores afirmaram que a presença de *Candida sp.* em estomatite por prótese total, é provavelmente ligada a inflamações extensas, evidenciadas nos estágios mais avançados (Tipo 3 e 4). Os autores levantaram a hipótese que a colonização das dentaduras ou da mucosa bucal por *Candida sp.*, pode ser secundária ao processo de inflamação, onde fatores inflamatórios não conhecidos favoreceriam o estabelecimento inicial deste fungo.

Ademais, segundo Arendorf e Walker (1979), outro fator que favorece a presença *C. albicans* na cavidade bucal e, por conseguinte, o desenvolvimento de estomatite por dentadura, trata-se do uso ininterrupto de próteses totais. De acordo

com Compagnoni et al. (2007), a identificação de colônias de *C. albicans* mostraram-se mais intensas nos indivíduos que apresentaram o hábito de dormir com suas próteses totais.

1.2 Formação do biofilme sobre prótese total

À semelhança de outros microrganismos presentes na cavidade bucal, a *C. albicans* possui a habilidade da adesão às resinas das próteses totais, quer seja diretamente ou através de uma intermediária camada formada por placa bacteriana (CHANDRA et al., 2001b).

Após a adesão à superfície, inicia-se o processo de formação do biofilme. Em contraste a vasta descrição dos biofilmes bacterianos, pouca atenção tem sido prestada, do ponto de vista médico, aos biofilmes formados por fungos. Porém, na odontologia, devido às respostas inflamatórias que podem ocorrer nas mucosas bucais, decorrente do contato com as próteses totais, os biofilmes têm sido o alvo do interesse de diversos autores (HAWSER e DOUGLAS, 1994; CHANDRA et al., 2001b; DONLAN e COSTERTON, 2002; KUHN et al., 2002; CHANDRA, ZHOU e GHANNOUM, 2005).

De acordo com Donlan e Costerton (2002), os biofilmes são conceituados como uma comunidade séssil caracterizada por células que formam microcolônias, e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito a taxa de crescimento microbiano e à transcrição genética. Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza, e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001; KUHN et al., 2002).

Neste sentido, Chandra et al. (2001b), avaliaram a suscetibilidade antifúngica da *C. albicans* frente à clorexidina e nistatina. Os resultados mostraram 50% de redução da atividade metabólica (RAM) de *C. albicans* desenvolvida em biofilmes às concentrações de 16 µg/mL para nistatina e 128 µg/mL para clorexidina;

e 50% de RAM de *C. albicans* desenvolvida em meio de cultura às concentrações de 1,0 µg/ml para nistatina e 4,0 µg/ml para clorexidina. Esses achados confirmam a hipótese de que microrganismos desenvolvidos em biofilmes são bem mais resistentes à ação desses produtos do que aqueles desenvolvidos isoladamente em meios de cultura.

Em outro estudo, Chandra et al. (2001a) descreveram com detalhes a formação do biofilme de *C. albicans* em lâminas de polimetilmetacrilato. Neste material ocorrem basicamente em três fases distintas: a) fase inicial (0 a 11 horas); b) fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas); c) fase de maturação (aproximadamente 38 horas a 72 horas). Inicialmente, as células leveduriformes de *C. albicans* aderem-se à superfície da lâmina, formando posteriormente microcolônias. Nas primeiras 11 horas, as comunidades de *C. albicans* aparecem como uma camada de células, devido ao crescimento e agregação das colônias. O desenvolvimento da fase intermediária é caracterizado pela emergência e predominância de substância não celular (polimérica), a qual se assemelha a uma “névoa” que forma um filme e cobre as microcolônias do fungo. Durante a fase de maturação, a quantidade de substância polimérica extracelular aumenta com o tempo de incubação e as comunidades de *C. albicans* são completamente cobertas por essa substância (Figura 1).

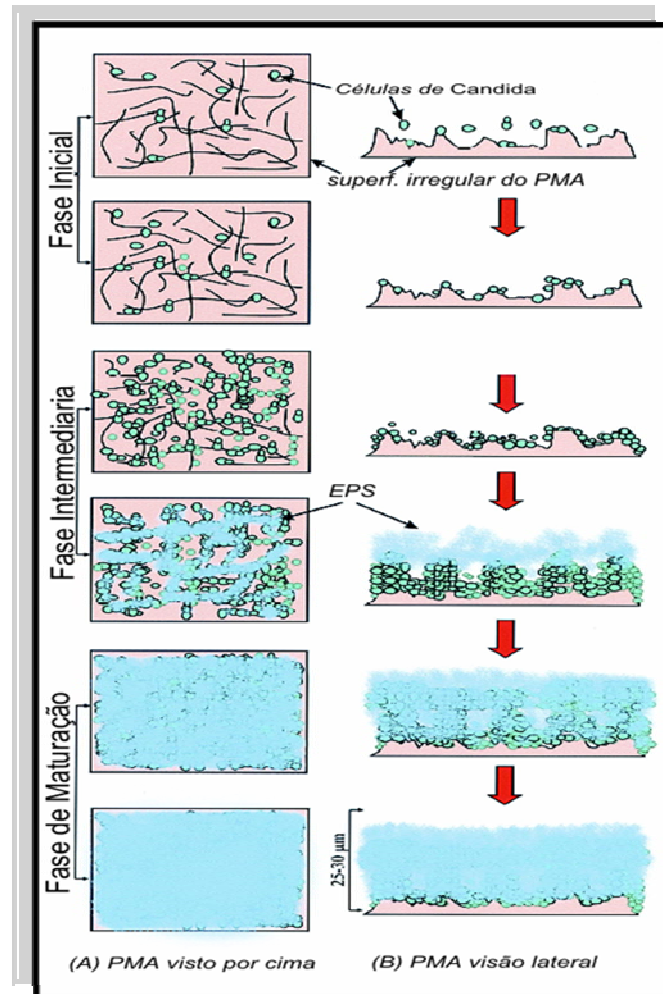


Figura 1: Representação esquemática da formação de biofilme de *C. albicans* em lâmina de polimetilmetacrilato (PMMA). Vista superior do biofilme (A). Vista lateral do biofilme (B). EPS (substância polimérica extracelular). Fonte: Chandra et al. (2001), com modificações.

Segundo Vasilas et al. (1992), um fator que pode beneficiar a proliferação de biofilmes de *C. albicans* na superfície da prótese total, diz respeito às irregularidades presentes nesta superfície. Quando a resina acrílica apresenta rugosidade superficial acima de $0,02 \mu\text{m}$, sua superfície torna-se passível de colonização (BOLLEN, LAMBRECHTS e QUIRYNEN, 1997), pois o crescimento em forma micelial da *Candida sp.* permite que esse fungo se desenvolva e se aloje no interior das ranhuras formadas, onde estará livre de forças externas de remoção, como o efeito autolimpante da saliva e da escovação, proporcionando um reservatório de fungos para uma futura reinfecção (SAMARANAYAKE, MCCOURTIE e MACFARLANE, 1980). Além disso, segundo Quiryne e Bollen (1995), as

superfícies rugosas proporcionam uma colonização e maturação mais veloz da placa microbiana sobre a prótese.

Neste cenário, parece lógico afirmar que a rugosidade superficial é extremamente crítica às próteses totais visto que, segundo Phillips (1986), a superfície externa vestibular e lingual da prótese total são as regiões que devem ser polidas, porém a superfície interna ou área basal convencionalmente não sofre processos de acabamento e polimento. Desta maneira, esta região deve apresentar valores de rugosidade superficial bem superiores a $0,02 \mu\text{m}$, tornando-se passível de adesão microbiana (BOLLEN, LAMBRECHTS e QUIRYNEN, 1997). Como agravante, de acordo com Davenport (1972), a abrasão provocada pela higienização através de escova dental, os ajustes clínicos periódicos com fresas e a deterioração do acrílico por substâncias (água e soluções higienizadoras) com o decorrer do tempo, são fatores que proporcionam a formação de irregularidades na resina acrílica de próteses totais compatíveis com o diâmetro de $1 \mu\text{m}$ dos cocos e $5 \mu\text{m}$ dos fungos (VAN REENEN, 1973), favorecendo o acúmulo e a penetração deste patógenos no interior da prótese. Neste sentido, estudos (THEILADE e BUDTZ-JORGENSEN, 1980; CATALAN, HERRERA e MARTINEZ, 1987) a respeito da composição e a formação do biofilme microbiano em bases de próteses de pacientes sadios e portadores de estomatite por uso de dentadura, constataram que alguns microrganismos poderiam estar presentes tanto na superfície externa da base da prótese, quanto na interna, onde, de acordo com Chau et al. (1995), a penetração destes microrganismos na resina acrílica pode alcançar até 3 mm. Deste modo, passam a ter maior relevância os cuidados de higienização realizados sobre as superfícies da prótese.

1.3 Controle do biofilme sobre prótese total

Cabe ao cirurgião dentista orientar o paciente de forma clara quanto aos cuidados de higienização adequados e quanto às técnicas a serem usadas de forma que compensem as limitações de cada paciente, conscientizando-o da necessidade de conservação e limpeza de suas próteses totais (PARANHOS et al., 2000).

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

A limpeza da prótese total é fator primordial na manutenção da saúde bucal dos pacientes edêntulos (KULAK-OZKAN, KAZAZOGLU e ARIKAN, 2002). A higienização inadequada da prótese total produz alterações inflamatórias nos tecidos de sustentação e odor desagradável (LIMA et al., 2006). Ainda em decorrência de uma higienização inadequada, é comum encontrarmos resíduos alimentares, pigmentos, cálculos dentários e placa microbiana aderidos à prótese (LIMA et al., 2006). No que tange a placa bacteriana, esta freqüentemente está associada ao maior agente etiológico da estomatite por prótese total, a *C. albicans* (NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998).

Na terapêutica da estomatite por prótese total, é inútil apenas a eliminação de seus patógenos presentes na cavidade bucal através de antifúngicos locais ou sistêmicos, se os tecidos bucais forem inoculados repetitivamente por uma prótese contaminada. De acordo com Webb et al. (1998c), a estomatite por prótese total está associada ao crescimento de *Candida* no biofilme sobre a prótese, e não na mucosa do palato. Por isso, o tratamento deveria ser direcionado à prótese, e não à mucosa.

Fundamentados nessa premissa, vários estudos (BUDTZ-JORGENSEN, 1979; RUDD et al., 1984; MOLINARI e RUNNELLS, 1991; KULAK et al., 1997; LIN et al., 1999; SILVA et al., 2006) têm sido realizados com intuito de se verificar qual método é o mais eficaz no controle do biofilme sobre a prótese total. Clinicamente, observa-se que para tal, o método mais comumente utilizado (60% a 90% dos usuários) é a escovação com água e sabão ou dentifrício (ABELSON, 1985; JAGGER e HARRISON, 1995). Porém, há indivíduos, como os idosos, que se tornam incapacitados de promover a higienização adequada de suas próteses totais através deste método, em virtude da redução da acuidade visual e da destreza manual (KULAK et al., 1997; LIMA et al., 2006). Nestes casos, a imersão da prótese em soluções químicas é a melhor opção (BUDTZ-JORGENSEN, 1979). Reforçando esta premissa, Dills et al. (1988), evidenciaram que estas substâncias apresentam atividade antimicrobiana mais efetiva do que a escovação com dentifrício.

O objetivo da imersão das dentaduras em soluções desinfetantes é a obtenção da descontaminação das próteses (ASAD, WATKINSON e HUGGETT, 1992). Desta forma, atuam no tratamento e na prevenção da estomatite por prótese total. Além disso, visto que as próteses totais ficam expostas a microrganismos patogênicos orais e não-orais, que incluem bactérias, vírus e fungos, as soluções desinfetantes recebem uma importância adicional, pois quando usadas após a

retirada e antes da inserção da prótese na boca, representam um método recomendado no controle da infecção cruzada no consultório odontológico e no laboratório de prótese (BRACE e PLUMMER, 1993; LIN et al., 1999).

Quanto ao mecanismo de ação das soluções desinfetantes, vale a pena ressaltar o fato que, em linhas gerais, todas as substâncias que possuem uma ou mais zonas ativas capazes de estabelecer interações com componentes celulares em sítios-alvo específicos das células microbianas são consideradas agentes antimicrobianos. De uma forma mais pragmática, pode-se também definir substância antimicrobiana como sendo uma substância que desempenha um efeito adverso na viabilidade (microbiocida) ou no crescimento e reprodução (microbioestático) de microrganismos. Geralmente, é a concentração da substância química antimicrobiana que determina a natureza da ação: se a concentração é baixa para as características do sistema onde é aplicado, então o efeito é de caráter bioestático; se a concentração é suficientemente elevada o agente atuará numa estrutura vital das células e a sua ação classificar-se-á como biocida (PAULUS, 1993).

Algumas substâncias antimicrobianas também possuem a capacidade de remoção da massa do biofilme. Estas são geralmente baseadas em produtos com propriedades dispersantes, quelantes, tensoativas, etc., cujos mecanismos de ação passam essencialmente pela fragilização da matriz polimérica dos biofilmes, pelo enfraquecimento das interações biofilme-superfície de adesão e pela dispersão de depósitos biológicos ou, idealmente, pela prevenção da formação de biofilmes (CLAUS e MULLER, 1996). Ao dispersarem as populações microbianas e/ou as substâncias poliméricas incorporadas no biofilme para o meio líquido, estas substâncias favorecem o processo de controle dos biofilmes, pois tornam os microrganismos mais susceptíveis à ação dos agentes antimicrobianos (CLOETE, JACOBS e BROZEL, 1998).

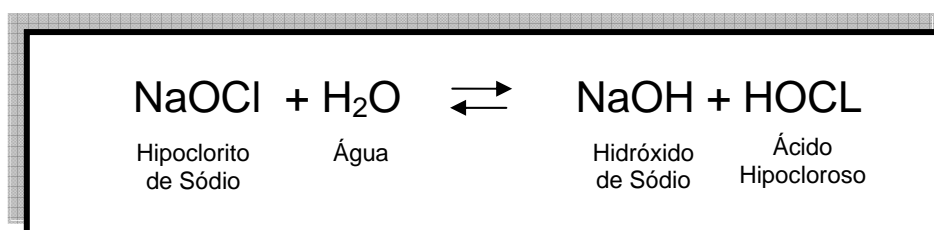
Idealmente, a remoção do biofilme somada à redução da viabilidade dos microrganismos que o formam é sempre pretendida no controle do biofilme sobre a prótese total, pois um biofilme residual composto por células mortas pode ainda atuar como uma fonte de endotoxinas, permitindo a sua rápida recolonização e provendo proteção para novos patógenos (MEILLER et al., 1999; CHEN e STEWART, 2000; LIAQAT e SABRI, 2008).

Atualmente, ainda há muitas discussões entre os pesquisadores da área a respeito do melhor agente desinfetante, assim como do período necessário para a desinfecção das próteses totais. A seleção da solução desinfetante deve ser sempre fundamentada na eficácia da desinfecção e na compatibilidade com os tecidos bucais, devido ao extenso número de porosidades na superfície das dentaduras que provocam um efeito residual (PAVARINA et al., 2003).

1.3.1 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio é amplamente utilizado no campo da desinfecção química em odontologia, pois apresenta uma série de propriedades, tais como: atividade antimicrobiana, baixo custo, fácil manuseio, desodorizante e baixa tensão superficial. Entretanto, deve ser utilizado com cautela por ser corrosivo a certos metais, sobretudo o alumínio (FUKUZAKI, 2006).

O hipoclorito de sódio unicamente existe em solução aquosa. Neste estado ele origina o hidróxido de sódio (base forte) e o ácido hipocloroso (ácido fraco) (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999). Assim sendo, em solução aquosa o hipoclorito de sódio exibe um equilíbrio dinâmico de acordo com a reação:



Diversos estudos demonstraram que o hipoclorito de sódio apresenta excelente atividade antimicrobiana. No entanto, o mecanismo exato pelo qual esta substância destrói microrganismos ainda não foi bem elucidado. Alguns autores acreditavam que o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio dava-se pela liberação de oxigênio nascente por parte do ácido hipocloroso, o qual,

supostamente, destruiria o microrganismo, pela formação de radicais oxigenados tóxicos. Esta teoria parece infundada, uma vez que outros compostos que liberam uma quantidade muito maior de oxigênio nascente, como a água oxigenada, não destroem o microrganismo tão rapidamente quanto os compostos clorados (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999).

Deste modo, sabe-se que a ação desinfetante de substâncias cloradas deve-se à liberação de cloro. Apesar de o hidróxido de sódio gerado pela reação do hipoclorito com a água também apresentar eficácia antimicrobiana, sabe-se que a formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito, é a principal responsável pela excelente atividade antimicrobiana da solução clorada (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999).

Dois efeitos antimicrobianos têm sido atribuídos ao cloro: inibição enzimática e formação de cloraminas, após reação com componentes do citoplasma microbiano. Muitas enzimas microbianas contêm o aminoácido cisteína, tendo assim cadeias laterais terminando em grupamentos sulfidril (SH). Tais enzimas apenas exercem suas funções, se o grupamento SH estiver livre e reduzido. O cloro é um forte agente oxidante, que promove a oxidação irreversível de grupamentos sulfidril (SH) de aminoácidos e proteínas microbianas para a forma de sulfetos (S-S). Evidentemente, tal efeito se dá tanto em proteínas associadas à membrana quanto sobre as proteínas presentes no citoplasma. Uma vez que as enzimas são proteínas especializadas, e como as proteínas são oxidadas pelo cloro, importantes reações metabólicas passam a ser interrompidas, originando a morte celular (WEBB et al., 1995; LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999; ESTRELA et al., 2002). O cloro também pode reagir com o grupamento amina (NH) de proteínas citoplasmáticas, formando cloraminas, compostos de reconhecida toxicidade, os quais interferem com o metabolismo celular. Todavia, como o efeito microbicida do cloro se dá rapidamente, mesmo em baixas concentrações, as reações de oxidação enzimáticas parecem preceder o acúmulo de cloraminas no citoplasma microbiano, sendo, por esta razão, o principal mecanismo envolvido na destruição da célula microbiana (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999; ESTRELA et al., 2002). Além desses efeitos, o hipoclorito de sódio também causa danos à parede e membrana celular (FUKUZAKI, 2006), assim como ao DNA (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999).

Considerando essas propriedades, os hipocloritos alcalinos podem ser utilizados na desinfecção de próteses totais, pois removem manchas, dissolvem a mucina e outras substâncias orgânicas e são bactericidas e fungicidas. Além disso, estes não dissolvem cálculos, mas podem inibir sua formação em próteses por dissolver a matriz orgânica do biofilme (BUDTZ-JORGENSEN, 1979; LIMA et al., 2006).

1.3.2 Clorexidina

Devido preencher quase todos os pré-requisitos de uma solução desinfetante ideal, no campo da prótese dentária, a clorexidina tem sido empregada na desinfecção de próteses removíveis. A clorexidina é um detergente catiônico, uma Bis-biguanida não tóxica que é preparada sob a forma de diversos sais, entre eles o acetato, cloridrato e o gluconato de clorexidina (FLOTRA, 1973). Seu efeito antimicrobiano de amplo espectro, incluindo *C. albicans*, efeito residual por várias horas depois da aplicação (WHITE, HAYS e JANER, 1997), e citotoxicidade mais baixa que do hipoclorito de sódio (FARDAL e TURNBULL, 1986) são predicados que ajudam a difundir seu uso.

A clorexidina foi introduzida na medicina em 1950, como desinfetante de amplo espectro bacteriano e, em 1954 iniciou o seu emprego de forma rotineira no tratamento de feridas na pele (FIDEL, MARQUES e ANTONIAZZI, 1995). Os primeiros estudos realizados na odontologia utilizaram a clorexidina na desinfecção de campos operatórios (CAWSON e CURSON, 1961). Na dentística tem sido largamente utilizada, demonstrando excelentes resultados no controle da cárie pela redução de *Streptococcus mutans* e espécies de *Lactobacillus* (FERRAZ et al., 2001). Na periodontia atua como auxiliar no tratamento controlando o crescimento de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (FERRAZ et al., 2001) e na prevenção da formação da placa bacteriana pela capacidade de aderir a substratos aniônicos como hidroxiapatita, películas, glicoproteínas salivares e bactérias, e pela sua lenta liberação dos sítios de retenção (GREENSTEIN, BERMAN e JAFFIN, 1986).

Segundo Lopes, Siqueira Junior e Elias (1999), em baixas concentrações, a clorexidina é bacteriostática, enquanto que, em concentrações mais elevadas, ela é bactericida. Por ser uma molécula catiônica, a clorexidina é atraída e adsorvida à superfície microbiana, na qual é carregada negativamente. Esta adsorção dá-se, principalmente, em componentes contendo fosfato. Na seqüência do processo de lise do microrganismo, a clorexidina é atraída para a membrana citoplasmática, na qual promove uma ruptura, permitindo a liberação de componentes citoplasmáticos de baixo peso molecular, como, por exemplo, íons potássio. Além disso, em nível de membrana, a clorexidina pode inibir a atividade de determinadas enzimas, como a adenosinase trifosfatase (ATPase). Se o efeito da clorexidina, devido à baixa concentração, pára nesse ponto, a substância tem um efeito bacteriostático.

O efeito bactericida da clorexidina é observado em concentrações mais altas, quando se verifica que o dano à membrana citoplasmática é mais severo, levando ao extravasamento de conteúdo citoplasmático de maior peso molecular, como ácidos nucléicos. Quando a concentração da substância é suficientemente elevada (100 a 500 mg/L), não há mais extravasamento do conteúdo citoplasmático microbiano, visto que este se torna precipitado, como resultado da reação da clorexidina com compostos fosfatados, como ATP (adenosina trifosfato) e ácidos nucléicos, formando complexos. Neste último caso, o efeito bactericida é extremamente rápido. A maioria das soluções de clorexidina usadas na clínica odontológica possui efeito bactericida (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999).

A clorexidina utilizada na rotina odontológica é comercializada em pH neutro, pois, nesta situação, a molécula de clorexidina é rapidamente adsorvida aos íons presentes na superfície dos microrganismos, facilitando, assim, a sua penetração na célula. Por outro lado, em condições ácidas, há uma supressão dos íons nesta superfície, o que ocasiona uma menor atração desta molécula pelos microrganismos e, por conseguinte, torna mais difícil a sua penetração na célula. Portanto, a clorexidina em pH neutro apresenta maior efeito biocida do que em concentrações ácidas (BONESVOLL et al., 1974).

1.4 Técnicas empregadas na análise de biofilmes

Tradicionalmente, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido o método de escolha para análise dos biofilmes devido à sua alta resolução. Esta técnica permite a observação da presença e da morfologia dos microrganismos, assim como da formação de biofilme e das diferentes associações microbianas na superfície de materiais poliméricos. Além disso, possibilita a análise minuciosa dos efeitos causados pelas soluções desinfetantes sobre microrganismos em biofilmes, como a remoção destes da superfície do material e alterações na sua morfologia. No entanto, esta técnica requer, como pré-requisito, que o biofilme deva ser submetido aos processos de desidratação e de fixação, portanto, esta não é apropriada para o estudo de características funcionais de microrganismos em biofilmes, como a viabilidade celular (WOOD et al., 2000).

A microscopia de fluorescência tem se revelado um método mais sensível na caracterização da viabilidade de microrganismos. A determinação da viabilidade por meio desta técnica ocorre através do uso de marcadores fluorescentes, denominados fluorocromos, que possibilitam a avaliação de aspectos funcionais e estruturais das células. O fluoróforo é a parte presente no fluorocromo responsável pela produção de fluorescência. A fluorescência ocorre por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons provindos de uma fonte (lâmpada ou feixe laser) e passam de um estado fundamental de energia mais baixa para um estado excitado de energia mais elevada. Nesse estado, o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso a energia deste estado excitado é dissipada em forma de fóton e o elétron retorna novamente para o estado de menor energia. A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e através dele gerar uma imagem (ALBERTS, 2004).

Entre as técnicas de microscopia de fluorescência, a microscopia confocal de varredura a laser, associada à aplicação de fluorocromos específicos à amostra a ser analisada, proporciona a análise de biofilmes sem o preparo dos espécimes, dispensando procedimentos como a desidratação, a embebição e a fixação (ZAURA-ARITE, VAN MARLE e TEN CATE, 2001). Deste modo, a arquitetura e organização interna do biofilme são mantidas, além de outras características, como

a espessura e a viabilidade celular (WOOD et al., 2000). Outra vantagem do microscópio confocal para o estudo do biofilme é sua capacidade de captar imagens em diferentes profundidades de foco, facilitando a visualização de espécimes irregulares, densos e espessos de maneira tridimensional (KUBINOVA e JANACEK, 2001).

Quanto às técnicas de análise da viabilidade das células fúngicas, a identificação de células viáveis através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) é demorada e não relata com confiança a capacidade metabólica de células apresentando crescimento lento ou no estado de não divisão (MILLARD et al., 1997). Isso é fundamental, visto que diante de alterações ambientais, microrganismos, entre eles a *C. albicans*, podem alterar seu estado fisiológico, interrompendo a divisão celular, mas mantendo suas atividades metabólicas. Por conseguinte, a determinação da viabilidade microbiana deve abranger outros aspectos além da proliferação celular (WEIGER et al., 2002). Métodos de contagem direta, os quais tipicamente envolvem pigmentação vital com indicadores, tais como o azul de metileno ou o sal de tretazolium, são utilizados para acessar a atividade de oxi-redução dos fungos. Embora esta análise seja simples para ser realizada, ela demonstra não ser fidedigna em fungos, devido haver inconsistência na retenção dos indicadores nestas células, assim como as superfícies destas células não serem específicas para estes indicadores (MILLARD et al., 1997).

Em relação à utilização de fluorocromos na análise da viabilidade de células fúngicas presentes em biofilmes, a literatura demonstra a freqüente utilização do fluorocromo FUN-1 com esse propósito. Através deste marcador, as células fúngicas metabolicamente não ativas (não viáveis) emitem uma coloração fluorescente difusa verde-amarelada, enquanto que nas células metabolicamente ativas (viáveis), o FUN-1 é convertido em estruturas cilíndricas intravacuolares de coloração laranja-avermelhada, fazendo com que estas células emitam esta mesma coloração. Entretanto, o FUN-1 pode provocar a formação de múltiplas estruturas cilíndricas intravacuolares nas células metabolicamente ativas na forma de hifas, possibilitando a superestimação do número de células viáveis quando a densidade celular é elevada no biofilme. Logo, o FUN-1 não é ideal para a avaliação da viabilidade celular de biofilmes fúngicos (JIN et al., 2005).

Na busca de um fluorocromo que suprisse a limitação do FUN-1, Jin et al (2005) obtiveram êxito na determinação da viabilidade de *C. albicans* em biofilmes,

através da utilização do Live/Dead® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada), embora este seja comumente utilizado na análise de viabilidade bacteriana. Este Kit é composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucléicos, o SYTO-9 e o iodeto de propídeo.

Através da coloração atribuída por esses fluorocromos, é possível se determinar a viabilidade microbiana tendo como parâmetro a integridade da membrana citoplasmática que é imprescindível para manutenção da viabilidade celular. Quando usado sozinho, o fluorocromo SYTO-9 penetra tanto em células vivas, quanto em células mortas. Em contraste, o iodeto de propídeo penetra somente em microrganismos mortos, com membrana comprometida. Quando utilizados simultaneamente, o iodeto de propídeo reduz o SYTO-9 no interior das células mortas. Deste modo, microrganismos vivos, com membrana citoplasmática intacta, demonstram fluorescência verde, enquanto microrganismos mortos, com membrana comprometida, apresentam fluorescência vermelha (JIN et al., 2005).

1.5 Estudos relacionados à eficácia antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio e de clorexidina no controle do biofilme sobre próteses totais

A literatura é vasta no que diz respeito à utilização do hipoclorito de sódio na desinfecção de próteses totais. Entre esses estudos, grande parte analisou a eficácia do hipoclorito de sódio em concentrações mais elevadas, como em 5,25% (GHALICHEBAF, GRASER e ZANDER, 1982; MOORE, SMITH e KENNY, 1984; RUDD et al., 1984; BELL et al., 1989; CHAU et al., 1995; YILMAZ et al., 2005). Em linhas gerais, os autores observaram que a imersão, em média durante 5 minutos, das próteses totais em hipoclorito de sódio nesta concentração é um método rápido, seguro e eficaz para desinfecção das próteses. Ademais, segundo MEILLER et al. (1999), após a desinfecção, o hipoclorito de sódio a 5,25% garantiu uma supressão das bactérias do biofilme por um período superior quando comparado ao glutaraldeído a 3%. Entretanto, estes autores chamam atenção para um possível efeito branqueador nas próteses totais ocasionado por esta solução concentrada.

Na tentativa de se minimizar os efeitos deletérios sobre as resinas acrílicas das próteses totais, o emprego do hipoclorito de sódio em baixas concentrações

também foi testado. De acordo com Webb et al. (1995), em concentrações abaixo da concentração mínima inibitória, o hipoclorito de sódio funciona como um produto anti-adesão para as espécies de *Candida*, porém não afeta os outros fatores relacionados à sua patogenicidade, tais como: adesão às superfícies e às células epiteliais bucais, co-agregação com biofilmes de outras espécies, produção de hifas, de proteinases e de proteínas constituintes da parede celular. A imersão das próteses por 8 horas em hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,02 e 0,0125% eliminou o crescimento de *C. albicans* e reduziu o crescimento de *Streptococcus gordonii*, removendo parte dos microrganismos das superfícies das amostras de resina acrílica (WEBB et al., 1998a). Na concentração de 0,05% associada à escovação das próteses com sabão de coco, provocou uma redução dos sinais clínicos da estomatite protética, apesar de não ter reduzido a viabilidade de *C. albicans* e *Streptococcus mutans* (BARNABE et al., 2004). Já o hipoclorito de sódio a 0,5% somente conseguiu 100% de eliminação para *C. albicans* após 20 minutos de atuação (DA SILVA et al., 2004).

Atualmente, tem-se optado pela utilização do hipoclorito de sódio em concentrações intermediárias na desinfecção de próteses totais, variando entre 1% a 2%, pois, desta maneira, alia-se a sua elevada performance antimicrobiana ao seu rápido tempo de ação.

Buergers et al. (2008) realizaram um estudo com o intuito de classificar 10 métodos de desinfecção amplamente utilizados de acordo com a sua eficácia em reduzir a colonização de *C. albicans* em material reembasador do tipo resiliente de dentaduras. Através dos resultados, foi observado que os únicos métodos de desinfecção eficazes na redução de colônias de *C. albicans* no material testado foi o produto comercial limpador efervescente (Blend-a-dent tabs) por 10 minutos, a imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e a irradiação de microondas com imersão em água (800 W, por 6 minutos). Já na concentração a 2%, o hipoclorito de sódio promoveu uma redução relativamente maior no número de microrganismos em um material reembasador resiliente, quando comparado com o tratamento por microondas (BAYSAN, WHILEY e WRIGHT, 1998).

A clorexidina pode ser empregada na desinfecção de próteses totais tanto na forma de enxaguatórios ou anti-sépticos, em concentrações mais baixas, como na forma de soluções desinfetantes, apresentando concentrações mais elevadas.

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

Na forma de enxaguatório, MacNeill et al. (1997) avaliaram os efeitos da tetraciclina tetracolorada e do digluconato de clorexidina a 0,12% no crescimento e viabilidade de *C. albicans*. A tetraciclina tetracolorada, mesmo em altas concentrações, não conteve o crescimento de *C. albicans*, enquanto que o digluconato de clorexidina a 0,12% inibiu o seu crescimento e replicação. Além disso, por meio de microscopia, o digluconato de clorexidina a 0,12% promoveu profundas mudanças na morfologia destes microrganismos.

Zaura-Arite, Van Marle e Ten Cate (2001) verificaram pela primeira vez o comportamento do biofilme oral após exposição a uma solução de clorexidina 0,2%, utilizando a microscopia confocal. A análise em camadas mostrou que a camada mais externa do biofilme apresentou, estatisticamente, menor viabilidade bacteriana que a camada mais interna, tanto em 24 quanto em 48 horas, deixando clara a ineficácia da clorexidina nas camadas mais internas de biofilme com mais de 24 horas de formação. Ainda através de microscopia confocal, Auschill et al. (2005) observaram que a clorexidina a 0,2% com 7% de álcool apresentou propriedades antibacterianas e anti-placa contra biofilmes formados em dispositivos de acrílico intra-orais, pois proporcionou uma redução na espessura e na viabilidade dos biofilmes, quando comparados com o grupo controle.

Na forma de anti-séptico, Theraud et al. (2004) avaliaram a eficácia de biocidas e de radiação contra várias espécies de microrganismos em suspensão e em biofilmes, ambos formados por culturas puras ou mistas. Neste estudo foram testados 5 anti-sépticos (Betadine – iodopovidona a 10%, Dermacide – lauril sulfato de sódio a 2%, Clorexidina – digluconato de clorexidina a 0,5%, Dosisepsine – digluconato de clorexidina a 0,05% e peróxido de hidrogênio a 3%), 6 tratamentos desinfetantes (hipoclorito de sódio a 1,2%, álcool 70° e Ecodiol a 0,25% e 0,5% e Ecodiol a 0,5% seguido de hipoclorito de sódio a 1,2%) e a radiação UV. Além disso, foram utilizados 3 isolados de fungos de origem clínica (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* em *Rhodotorulla rubra*) e 2 de origem ambiental (*C. albicans* e *Cryptococcus uniguttulatus*). A Clorexidina (digluconato de clorexidina a 0,5%) foi o único agente fungicida eficaz contra todos os microrganismos testados neste estudo, tanto em suspensão quanto em biofilmes.

Porém, à semelhança da desinfecção através dos hipocloritos de sódio, atualmente, também se tem optado pelo emprego de soluções de clorexidina em maiores concentrações, com a intenção de garantir uma desinfecção eficaz e mais

rápida. DePaola et al. (1984) testaram a atividade antimicrobiana de 14 produtos disponíveis no mercado (Kleenite, Efferdent, Polident, Mersene, gluconato de clorexidina a 1%, Clorasséptico, Listerine, Greene Mint, Signal, Scope, Lavoris, Cepacol, Betadine Mouthrinse Gargle) contra microrganismos patogênicos (*P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *E. aureus*, *C. albicans* e *T. glabrata*) em 16 pacientes cancerígenos imunodeprimidos. Os melhores agentes com atividade inibitória e bactericida foram o Kleenite, Efferdent, Polident, Listerine, Clorasséptico e gluconato de clorexidina a 1%.

Sesma et al. (1999) se propuseram a avaliar a eficácia de 3 métodos caseiros de higienização de próteses através da análise em MEV. Constatou-se que o uso de escova e dentífrico não foi eficiente na remoção de placa bacteriana, e que embora a associação com o produto efervescente consiga melhorar as condições de higiene das próteses, a combinação do método mecânico com a clorexidina a 2% foi mais efetiva na supressão dos microrganismos. Ainda nesta concentração, a clorexidina associada ao fluconazol no tratamento da estomatite por prótese total implicou em uma significativa melhora da inflamação generalizada do palato e diminuição da colonização por *C. albicans*, quando comparados com o tratamento isolado, através do fluconazol ou através de novas próteses (KULAK, ARIKAN e DELIBALTA, 1994).

Através de um estudo *in vitro*, Lamfon et al. (2005) avaliaram a composição do biofilme das próteses e a susceptibilidade de *Candida* spp. a agentes antifúngicos. O digluconato de clorexidina não foi eficaz quando empregado na concentração até 0,3%. Na concentração de 1,25%, reduziu o crescimento de *Candida ssp.*, entretanto, não foi notado crescimento fúngico na concentração de 2,5%.

Neste contexto, pesquisas comparativas sobre a eficácia da desinfecção de prótese totais entre as soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina também foram realizadas.

No estudo de Kulak et al. (1997), foi realizada a comparação entre a efetividade da escovação com da imersão em soluções efervescentes (Corega, Dentpur e Fittydent), soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio a 5% e clorexidina a 1%) e um enxaguatório bucal (Ipanol). A efetividade das soluções foi avaliada por meio do MEV. As imagens demonstraram que todos os métodos de limpeza removeram os microrganismos das superfícies das amostras. No entanto, as

soluções de hipoclorito de sódio a 5% e de clorexidina a 1% (Savlon) foram significativamente mais efetivas. As soluções efervescentes (Corega, Dentpur e Fittydent) e a escovação foram similares entre si e superiores à imersão em Ipanol. De acordo com os autores, a escovação não reduziu eficientemente os contaminantes superficiais das amostras em consequência das irregularidades da resina acrílica.

Pavarina et al. (2003) analisaram a eficácia de um protocolo de limpeza e desinfecção de próteses totais, através da imersão por 10 minutos em cada uma das seguintes soluções desinfetantes: gluconato de clorexidina a 4%, hipoclorito de sódio a 1%, Biocide (iodóforo) e Amosan (peróxido alcalino). Como resultado, todas as soluções desinfetantes foram capazes de reduzir o crescimento dos microrganismos, exceto Biocide (iodóforo), o qual não foi tão efetivo quanto às outras soluções na inativação dos microrganismos.

A eficácia antimicrobiana de 6 desinfetantes e seus efeitos na rugosidade superficial de resina acrílica quimicamente polimerizada foram analisadas por Da Silva et al. (2008). De acordo com os resultados, as soluções desinfetantes de maior eficácia foram o hipoclorito de sódio a 1%, o glutaraldeído a 2% e a clorexidina a 2%, seguidos pelo vinagre a 100% e o perborato de sódio a 3.8% com eficácia intermediária. Por outro lado, as tiras de perborato de sódio não foram consideradas como uma alternativa válida para a desinfecção de resina acrílica. Além disso, os testes de rugosidade superficial demonstraram que houve diferença estatística na rugosidade superficial somente para a clorexidina a 2%, com a qual a rugosidade diminuiu e para o perborato de sódio a 3.8%, para o qual a rugosidade aumentou.

Diante da vasta literatura a respeito da eficácia antimicrobiana de soluções químicas na desinfecção de bases de próteses totais, Nikawa et al. (1999) realizaram uma revisão literatura sobre este assunto. Como resultados, observaram uma grande variação dos resultados entre os estudos, os quais são dependentes dos métodos aplicados na avaliação da eficácia das substâncias higienizadoras, ou seja, algumas substâncias higienizadoras *in vivo* não foram tão eficazes quando em experimentos laboratoriais. Os autores constataram também a total ausência de padronização nas metodologias dos estudos sobre este assunto. Por fim, na tentativa de minimizar este conflito, os autores estabeleceram que para que uma solução higienizadora possa ser considerada significativamente efetiva, esta deveria apresentar algumas propriedades, entre elas uma taxa de remoção maior que 90%

do biofilme e o impedimento subsequente do crescimento da placa microbiana sobre a superfície dos materiais testados.



2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Considerando o efeito antimicrobiano das soluções de gluconato de clorexidina a 4% e hipoclorito de sódio a 1% e 2%, este trabalho teve como objetivo:

Analisar o efeito destas soluções desinfetantes na viabilidade, na remoção e na morfologia de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resinas acrílicas termopolimerizáveis através de microscopia confocal, de cultura microbiológica e de MEV.



3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Confeção dos corpos-de-prova

3.1.1 Confeção dos padrões de silicona

Para confecção dos padrões de silicona, foi utilizada uma matriz metálica, de forma retangular, medindo 30 x 5 x 5 mm. Cada matriz foi preenchida com silicona de condensação de uso laboratorial Zetalabor (Hard 85 shore-A, Zhermack, Italy) e prensada entre duas placas de vidro (JON Com de produtos odontológicos LTDA, São Paulo, SP) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. e Ind. farmacêutica LTDA, São Gonçalo, RJ), sob peso de 5 kg, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, o padrão de silicone foi removido da matriz e os excessos foram cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi (Figura 2).

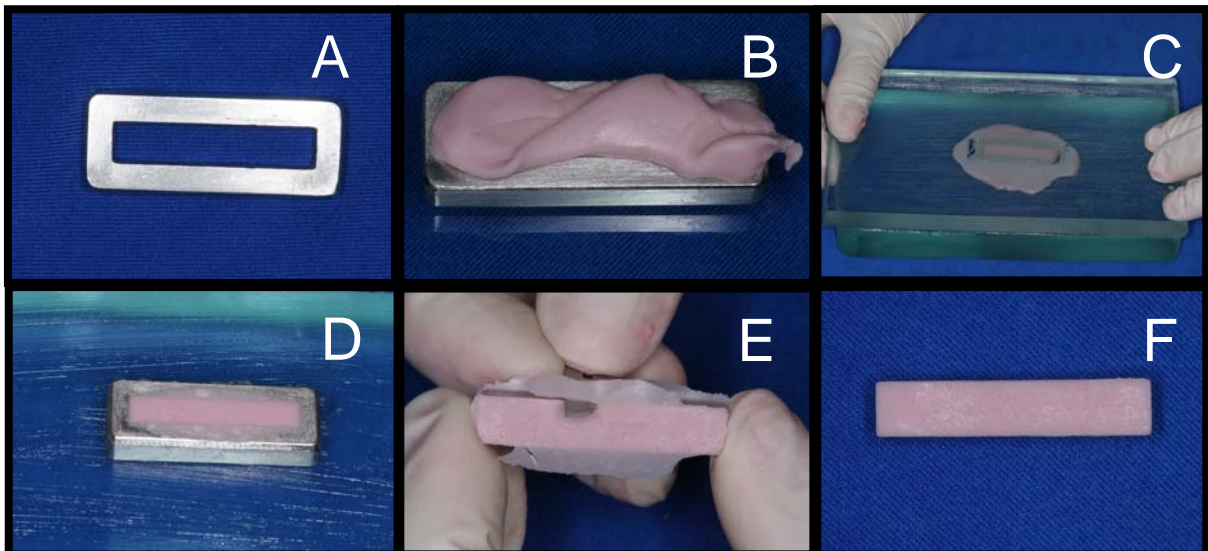


Figura 2: Confeção dos padrões de silicona. Matriz metálica utilizada na confecção dos padrões de silicona (A). Preenchimento da matriz metálica com silicona de condensação Zetalabor (B). Após preenchimento da matriz, a silicona foi prensada entre duas placas de vidro com um peso de 5 kg por 10 minutos (C – D). Os excessos de silicona dos padrões foram removidos através de lâmina de bisturi (E). Forma final dos padrões de silicona (F).

3.1.2 Inclusão dos padrões de silicona em mufla

Os padrões de silicona foram incluídos em muflas de latão polido com pino nº 6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP), anteriormente isoladas com vaselina sólida. Posteriormente, as muflas metálicas foram preenchidas com gesso pedra tipo III (Gesso Pedra Herodent, Vigodent S/A Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ), manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand Comercial, São Paulo, SP) com espátula para gesso (Indusbello Ind. de Instr. Odontológicos, Londrina, PR), sob vibração.

Após a presa, os padrões de silicona foram colocados sobre o gesso e uma nova camada deste foi colocada entre eles, a fim de fixá-los na mufla. Esperado o tempo de presa da segunda camada, em seguida, foi aplicado o isolante Cel-Lac (S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ) em toda superfície. A contra-mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e, posteriormente, foi posicionada e devidamente preenchida com gesso pedra tipo III, conforme condições técnicas descritas anteriormente.

As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos médicos Odont. Acess. LTDA., Araraquara, SP) com 0,5 kgf de pressão, por uma hora, e, em seguida, foram abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas.

As etapas supracitadas estão ilustradas a seguir na Figura 3.

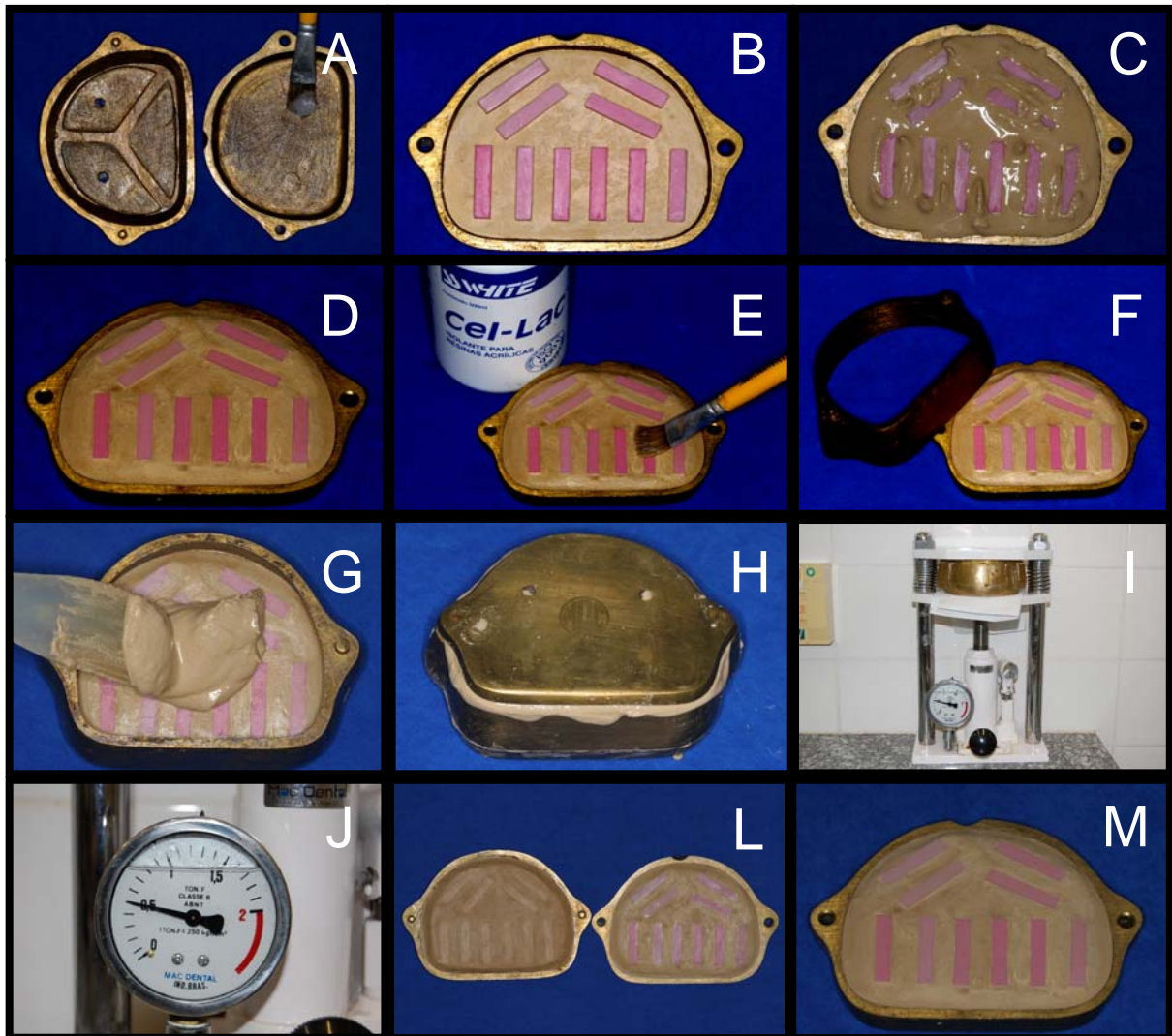


Figura 3: Inclusão dos padrões de silicone em mufla. Vaselinamento da mufla metálica previamente a colocação do gesso (A). Após a presa do gesso, os bastões de silicone foram distribuídos e fixados na mufla com uma segunda camada de gesso (B – D). Aguardado o tempo de presa da segunda camada, foi aplicado isolante Cel-Lac em toda superfície do gesso (E). Preenchimento da contra-mufla com gesso (F – G) e colocação da tampa metálica (H). Em seguida, foi realizada a prensagem da mufla, com 0,5 kgf de pressão, por uma hora (I – J). Após 1 hora, a mufla foi reaberta para ser realizada a remoção dos padrões de silicone (L – M).

3.1.3 Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento dos bastões de resina acrílica

Para prensagem, foi utilizada a resina acrílica incolor termopolimerizável Lucitone 550 (Dentsply International INC., Chicago, IL, USA), homogeneizada com auxílio de uma espátula nº 31 (SS White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos, Florianópolis, SC), utilizando-se a proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido, conforme orientações do fabricante. O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante Cel – Lac, com auxílio de um pincel de pêlo de marta (Condor, nº456, Condor S.A., São Bento do Sul, SC) e preenchido com a resina acrílica na fase plástica. A superfície do gesso na contra-mufla foi vaselinada e, em seguida, adaptada a sua respectiva porção inferior para serem prensadas em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5 kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica apresentou-se estável, a pressão foi aumentada para 1 kgf e por fim, até atingir 1,5 kgf. Após a estabilização do ponteiro em 1,5 kgf e escoamento completo do excesso da resina acrílica, a mufla foi novamente aberta e a película de resina acrílica excedente eliminada com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ). A mufla foi novamente fechada e levada para prensa hidráulica sob pressão de 1,5 kgf durante 30 minutos.

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia, Piracicaba, SP), passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais, e levada, em água, à polimerizadora microprocessada digital, modelo Banho Maria (Solab, Piracicaba, SP), para que se processe a termopolimerização com a seguinte programação: a temperatura da água se elevou até 73°C e se estabilizou durante 90 minutos, em seguida, tornou a subir até atingir 100°C, que foram mantidos por mais 30 minutos

Ao final da demuflagem, foram obtidos bastões de resina acrílica, nos quais foi dado o acabamento com o auxílio de fresa de tungstênio em baixa velocidade (SARTORI et al., 2006).

As etapas supracitadas estão ilustradas a seguir na Figura 4.

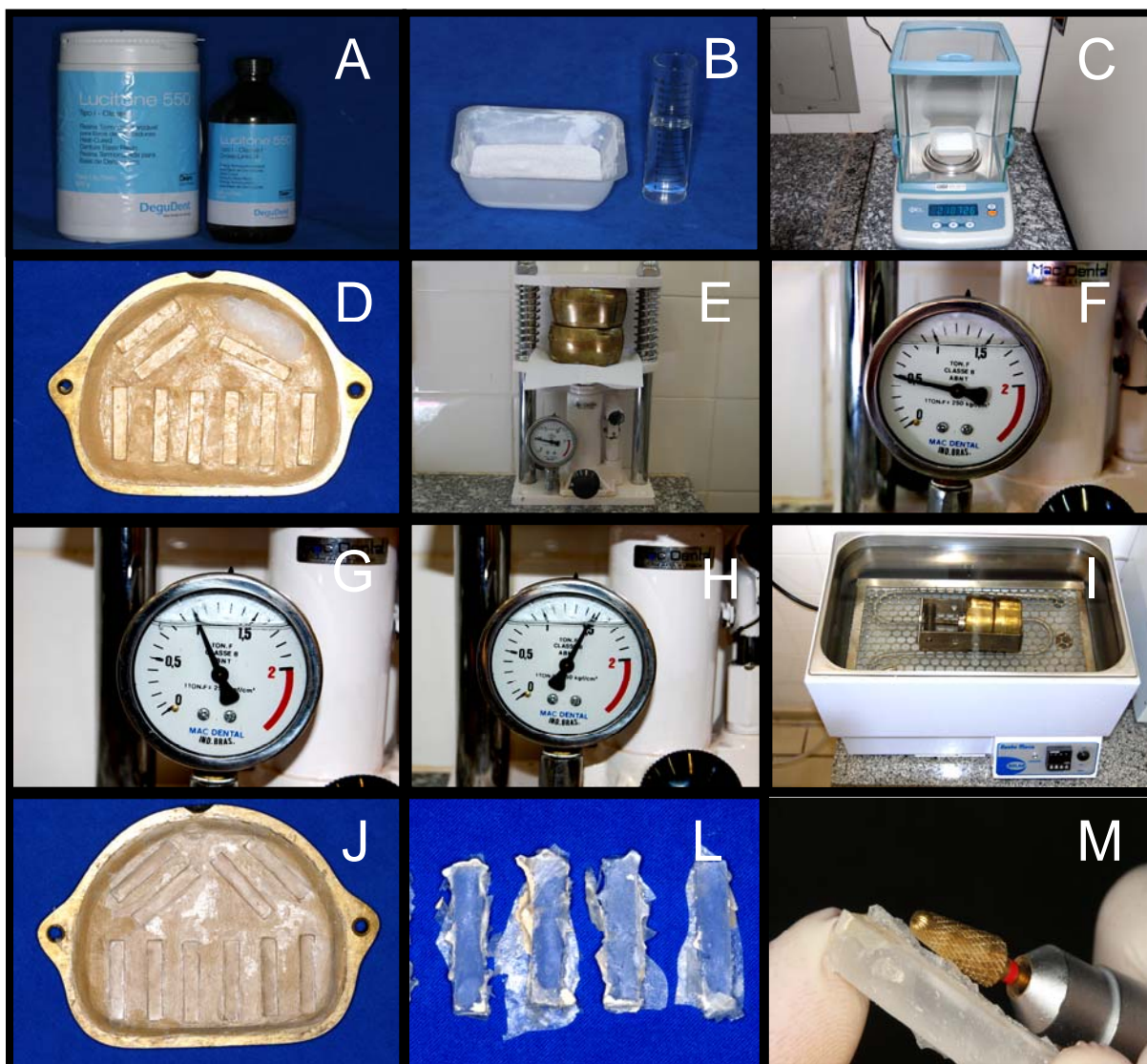


Figura 4: Preenchimento dos moldes, termopolimerização e acabamento dos bastões de resina acrílica. A resina Lucitone 550 (A) foi manipulada conforme a proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido (B – C), conforme orientações do fabricante. A seguir, foi realizado o preenchimento dos moldes com a resina na fase plástica (D). Primeiramente, a resina foi prensada com pressão de 0,5 kgf (E – F), a seguir, a pressão foi aumentada para 1 kgf (G) e por fim, até atingir 1,5 kgf (H). Mufla em prensa de aço inoxidável na polimerizadora microprocessada digital (I). Demuflagem para remoção dos bastões de resina (J – L). Acabamento dos bastões de resina com fresa de tungstênio (M).

3.1.4 Lixamento dos bastões de resina acrílica, avaliação da rugosidade superficial, seccionamento e esterilização dos corpos-de-prova

Cada bastão de resina acrílica teve uma face escolhida, na qual foi realizado o lixamento manual, em forma de oito (VERRAN e MARYAN, 1997), por cerca de 30 segundos, por meio de lixa d'água na granulação 120 (Norton Abrasivos, São Paulo, SP) em politriz circular (Dp-10, Struers-Panambra, São. Paulo, SP, Brasil), em baixa velocidade, sob refrigeração.

Durante os ensaios iniciais desta pesquisa, foram realizadas leituras, por meio de rugosímetro, na superfície mais crítica para higienização das próteses totais, a superfície interna. Os valores obtidos oscilaram entre 1 e 2 μm . Baseado nisto, esta mesma média de rugosidade superficial foi determinada na face lixada dos bastões de resina, sendo mensurada através do aparelho rugosímetro Hommel Tester T 1000 basic (Hommelwerke GmbH, ref. # 240851, Schwenningen, Germany). A leitura considerada foi a média aritmética (R_a) entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho, onde o percurso de medição foi de 4,8 mm, comprimento de onda limite 0,8 mm e velocidade de 0,5 mm/s. Foram efetuadas 6 leituras na superfície lixada de cada bastão de resina acrílica (RAHAL et al., 2004).

Paralelamente à face rugosa de cada bastão, por meio de um disco diamantado (Extec dia. wafer blade 4"x.012 x 1/2 high concen., Erios, São Paulo, SP - Brasil), foi obtida uma lâmina de resina acrílica (30 x 5 x 1 mm). Cada lâmina sofreu uma redução no seu comprimento, através do seu seccionamento em 5 partes iguais, dando origem aos corpos-de-prova propriamente ditos, medindo 5 x 5 x 1 mm (LAMFON et al., 2003). Ao final, foram obtidos 60 corpos-de-prova.

Em seguida, os corpos-de-prova foram submetidos à limpeza em ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Arotec, Odontobrás, São Paulo, Brasil) por 20 minutos (PEREIRA-CENCI et al., 2007) em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina.

Posteriormente, os corpos-de-prova foram deixados em ar livre para sua secagem e, em seguida, embalados individualmente para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil – Central de esterilização comércio e indústria, Campinas, SP) (SILVA et al., 2006; MIMA et al., 2008).

As etapas supracitadas estão ilustradas a seguir na Figura 5.

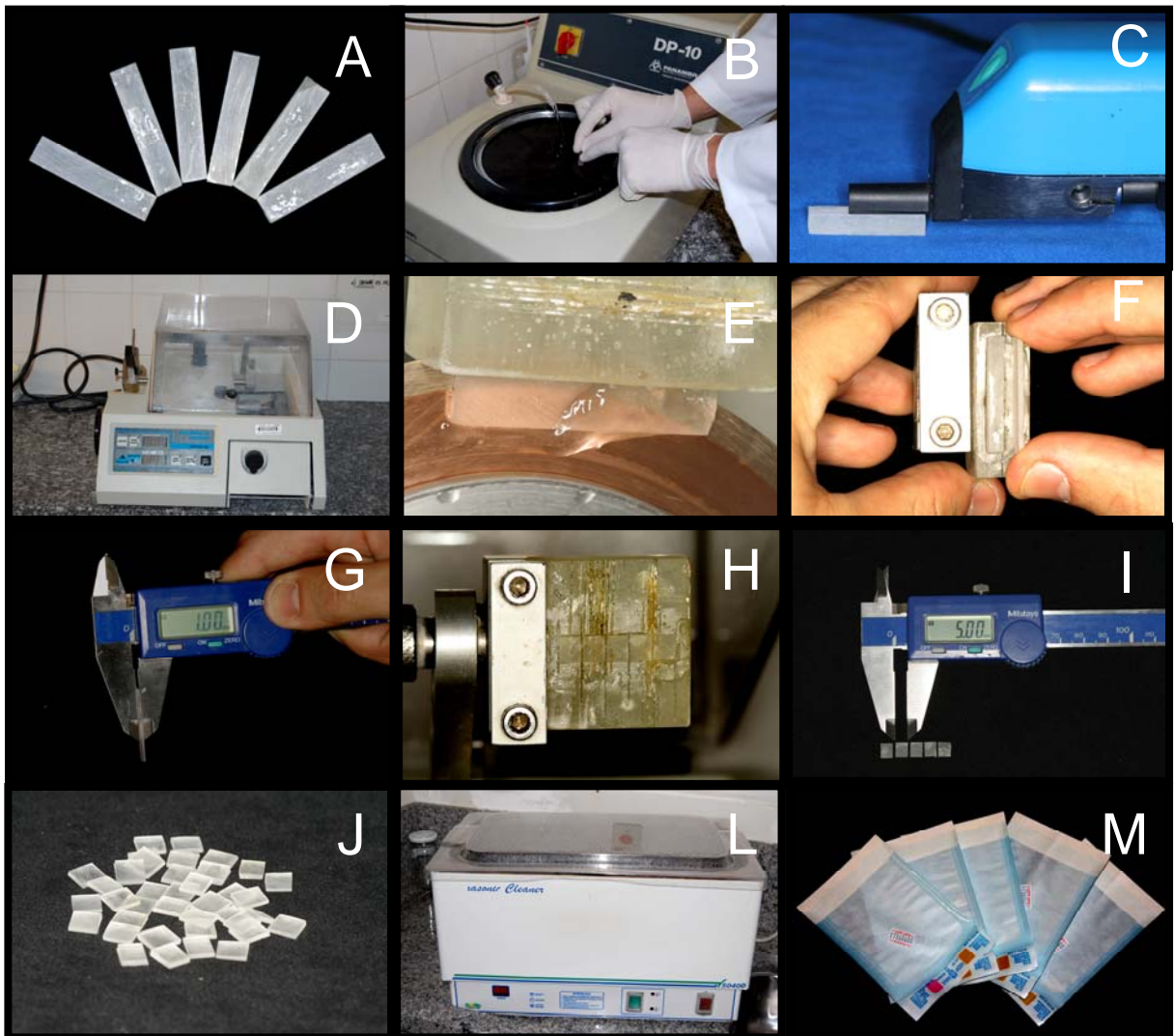


Figura 5: Lixamento dos bastões de resina acrílica, avaliação da rugosidade superficial, seccionamento e esterilização dos corpos-de-prova. Após o acabamento dos bastões de resina acrílica (A), foi realizado o lixamento em politriz de uma face do bastão, através de lixa d'água, na granulação 120 (B). A padronização da rugosidade superficial média de cada bastão foi averiguada através do aparelho rugosímetro (C). A seguir, em máquina de corte digital (D), foi realizado um corte de uma lâmina com 1 mm de espessura, paralela à face rugosa do bastão (E – G). Posteriormente, esta lâmina foi seccionada em cinco partes iguais (H – I), para que houvesse a obtenção dos corpos-de-prova propriamente ditos (J). Por fim, os corpos-de-prova foram levados ao ultrassom (L) para remoção dos debris e, em seguida, foram embalados para serem submetidos à esterilização (M).

3.2 Inoculação dos corpos-de-prova**3.2.1 Microrganismos e condições de crescimento**

Todos os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Centro Integrado de Pesquisa-1 (CIP-1) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, sempre em condições assépticas, em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70°.

C. albicans (ATCC 90028) foi reativada de sua cultura original contendo Tryptic Soy Broth (TSB) (Accumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI, USA) a -70°C, em 10 mL de meio de cultura TSB (CAMPANHA et al., 2007) com cloranfenicol (Quemacetina Succinato/ Carlo Erba®, Milano, MI, Itália) (THERAUD et al., 2004), e incubada durante 24 horas a 37°C em estufa (Orion, Fanem, São Paulo, SP), em condições aeróbicas. Após 24 horas, foi executada a centrifugação (Centrifuge 5804R, Eppendorf) da suspensão por 10 minutos, com velocidade de 5.000 rpm, a 22°C, para separação dos microrganismos do sobrenadante. Os fungos isolados foram lavados 2 vezes em solução salina fosfatada (PBS) para remoção de impurezas, e o pellet final foi resuspenso em PBS. A seguir, a suspensão foi agitada por 15 segundos e a turbidez ajustada espectrofotometricamente (Pharmacia Biotech, Ultraspec 100, New Jersey, USA), a 600 nm, até atingir absorvância similar ao padrão 0,5 da escala Mc Farland. Este procedimento assegurou a preparação de uma suspensão celular com uma concentração final de 1.10^7 cel/mL (CHANDRA et al., 2001b) em TSB com cloranfenicol (Figura 6).

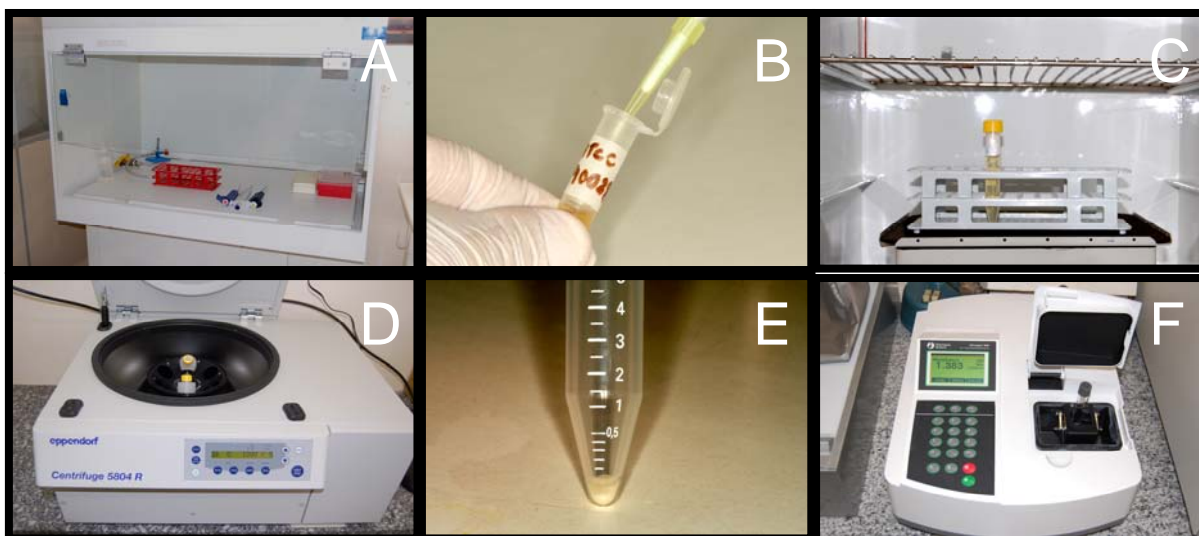


Figura 6: Microrganismos e condições de crescimento. Em fluxo laminar (A), foi retirada uma alíquota do estoque congelado da cepa de *C. albicans* ATCC 90028 para sua reativação em caldo TSB em estufa por 24 horas (B – C). Cessado este período, a suspensão fúngica foi centrifugada para separação dos microrganismos do sobrenadante (D – E). Após o processo de lavagem em PBS, o pellet final foi resuspenso em PBS para ajuste da concentração em espectrofotômetro (F).

3.2.2 Formação do biofilme

Utilizando uma pinça estéril (S.S. White Art. Dentários LTDA, Rio de Janeiro, RJ), cada corpo-de-prova foi colocado em um poço de uma placa de cultura de tecidos de 24 poços (TPP, Switzerland), no qual foi dispensado 1 mL da suspensão celular, através de pipetas de precisão e ponteira descartáveis, deixando os corpos-de-prova totalmente submersos. Inicialmente, todos os corpos-de-prova foram deixados em cultura com *C. albicans* por 90 minutos em estufa a 37°C sob agitação (THEIN, SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2007). Cessado este tempo, os corpos-de-prova foram individualmente e suavemente lavados 3 vezes em 2 mL de PBS (HAWSER e DOUGLAS, 1994) para garantir a remoção de células não aderidas ao substrato (KUHN et al., 2002). A seguir, os corpos-de-prova foram reinsertos em 1 mL de TSB com cloranfenicol e incubados em estufa a 37°C sob agitação por 24 horas (KUMAMOTO, 2002; PEREIRA-CENCI et al., 2008) para o desenvolvimento do biofilme (Figura 7).



Figura 7: Formação do biofilme. Imersão do corpo-de-prova, com a face rugosa voltada para cima, em um poço da placa de cultura, contendo 1 mL do inóculo **(A)**. Após 90 minutos, foi realizada a lavagem do corpo-de-prova em 2 mL de PBS para a remoção das células não aderidas ao material **(B)**. A seguir, o corpo-de-prova foi transferido para um novo poço com 1 mL de TSB com cloranfenicol, para que houvesse a formação do biofilme por 24 horas **(C)**.

3.3 Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável

A análise do efeito das soluções desinfetantes utilizadas neste estudo sobre a viabilidade de *C. albicans* presentes em biofilme sobre os corpos-de-prova de resina acrílica termopolimerizável foi realizada através do microscópio confocal Leica TCS – SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) e de cultura microbiológica.

3.3.1 Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* através de microscopia confocal

3.3.1.1 Desinfecção dos corpos-de-prova

Inicialmente, procedeu-se a divisão aleatória de 24 corpos-de-prova contaminados com *C. albicans* em 4 grupos (n=6), em função das soluções testadas. Neste estudo foram selecionadas as soluções de hipoclorito de sódio a 1% e 2% e

3 Material e Métodos

gluconato de clorexidina 4%. No grupo controle, os corpos-de-prova foram submetidos apenas a imersão em água destilada estéril (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos corpos-de-prova de acordo com a solução desinfetante utilizada.

Grupos	Solução desinfetante	Tempo
G1 (controle)	Água destilada estéril	10 minutos
G2	Hipoclorito de sódio a 1%*	10 minutos
G3	Hipoclorito de sódio a 2%*	5 minutos
G4	Gluconato de clorexidina a 4%*	10 minutos

* Manipuladas em farmácia de manipulação (Calêndula Farma, Bauru, SP)

Durante a desinfecção, os corpos-de-prova foram imersos, individualmente, em 2 mL da solução desinfetante relativa ao seu grupo. Posteriormente, cada corpo-de-prova foi suavemente imerso 3 vezes consecutivas (THERAUD et al., 2004) em 3 diferentes poços da placa de cultura, com 2 mL de PBS em cada poço, para a remoção da solução desinfetante e das células desprendidas em função destas soluções (Figura 8).



Figura 8: Desinfecção dos corpos-de-prova. Após 24 horas de formação do biofilme (A), cada corpo-de-prova foi transferido para um novo poço, contendo 2 mL da solução desinfetante, onde permaneceu pelo tempo específico de cada grupo (B). Encerrado o tempo de desinfecção, foram realizadas 3 lavagens dos corpos-de-prova em 3 diferentes poços para remoção da solução desinfetante e das células desprendidas em função destas soluções (C).

3.3.1.2 Processamento dos corpos-de-prova para microscopia confocal

Como a análise no microscópio confocal não permite a observação de mais de um corpo-de-prova por vez, cada corpo-de-prova foi processado de forma particular.

Assim, concluída a lavagem em PBS, cada corpo-de-prova foi transferido para um poço da placa de cultura de tecidos de 24 poços, contendo 1 mL de PBS, misturado com 1 μM do fluorocromo SYTO-9 (Molecular Probes, Invitrogen Brasil Ltd., São Paulo, SP) e 1 μM do fluorocromo iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As concentrações dos fluorocromos foram ajustadas durante os ensaios piloto, de modo a proporcionar um melhor contraste entre as células fúngicas e a resina acrílica. Na seqüência, foram aguardados 20 minutos para que houvesse a difusão dos fluorocromos no biofilme (JIN et al., 2005). Este processo foi realizado na ausência de luz a 37°C, de acordo com as orientações do fabricante.

Imediatamente após o período de incubação, cada corpo-de-prova foi cuidadosamente montado em lamínula de vidro associada a óleo de imersão, com a face rugosa para baixo, para análise do biofilme em microscópio confocal Leica TCS – SPE. A objetiva usada foi uma lente de imersão em óleo (40x; abertura numérica de 1,15).

As etapas supracitadas estão ilustradas a seguir na Figura 9.



Figura 9: Processamento dos corpos-de-prova para microscopia confocal. Utilização dos fluorocromos SYTO-9 e iodeto de propídeo para análise da viabilidade celular **(A)**. Imersão do corpo-de-prova em 1 mL de PBS com 1 μM de SYTO-9 e 1 μM de iodeto de propídeo, aguardando-se 20 minutos na ausência de luz para a difusão dos fluorocromos **(B)**. Após este período, cada corpo-de-prova foi montado com a face para baixo em lâmina de vidro para análise em microscópio confocal **(C)**.

3.3.1.3 Análise dos corpos-de-prova no microscópio confocal

A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada em 6 diferentes campos (SMITH e HUNTER, 2008), de acordo com a figura 10, a fim de que não houvesse a possibilidade de análise de um mesmo campo repetidas vezes.

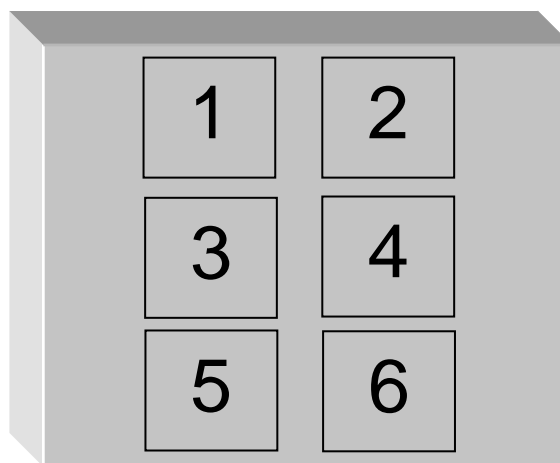


Figura 10: Seqüência padrão de análise dos 6 campos dos corpos-de-prova no microscópio confocal.

Para a análise das células do biofilme de cada campo, foi realizada a tomada de uma série de secções ópticas horizontais, com 1 µm de intervalo, por toda a profundidade do biofilme. De cada secção foram adquiridas duas imagens, de forma seqüencial. Para o SYTO-9 foi usada a excitação em 488 nm, e o detector espectral foi programado para a faixa de 495 a 575 nm. Para o Iodeto de Propídeo, a excitação foi em 532 nm, e a detecção entre 595 e 730 nm. A aquisição seqüencial elimina qualquer interferência que possa existir do fluorocromo verde sobre o vermelho (*cross-talk*). O programa utilizado para a aquisição das imagens foi o Leica LAS AF (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany). Posteriormente, também através deste programa, foi realizada a união das duas imagens de cada secção, assim como, o agrupamento de todas as secções de cada campo, gerando uma imagem final, onde foi possível identificar as células viáveis e não viáveis em cada campo do corpo-de-prova.

As células viáveis, sem comprometimento de membrana citoplasmática, apresentaram coloração verde, indicando que somente o SYTO-9 estava presente no seu interior. As células não viáveis, com comprometimento de membrana citoplasmática celular, apresentaram coloração amarelo-avermelhada, indicativa da presença do SYTO-9 e do iodeto de propídeo no seu interior.

A contagem dos microrganismos em cada campo de cada corpo-de-prova foi realizada através do programa ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, EUA) (PEREIRA-CENCI et al., 2008), que proporcionou a identificação e a contagem das células viáveis e não viáveis. Os valores médios de cada grupo encontrados foram catalogados para posterior análise estatística.

3.3.2 Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* através de cultura microbiológica

Numa segunda etapa, após a análise por meio do microscópio confocal, outros 24 corpos-de-prova foram encaminhados para análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* através de cultura microbiológica.

3.3.2.1 Desinfecção dos corpos-de-prova

A desinfecção dos corpos-de-prova procedeu-se de maneira idêntica a adotada para microscopia confocal (item 3.3.1.1), com exceção que, após a lavagem pra remoção da solução desinfetante, os corpos-de-prova foram transferidos para um novo poço da placa de cultura com 1 mL de TSB, onde permaneceu por 48 horas, oferecendo, assim, condições de recuperação aos fungos remanescentes na resina.

3.3.2.2 Processamento dos corpos-de-prova para cultura microbiológica

Cessado o período de recuperação do microrganismo, através de pinça metálica estéril, cada corpo-de-prova foi retirado do poço da placa de cultura e colocado em tubo de ensaio, contendo 500 µL de PBS. Em seguida, o tubo de ensaio foi imerso em aparelho ultrassom (Ultrasonic Cleaner 2840D, Odontobrás, Ribeirão Preto, São Paulo) por 20 minutos para separação do biofilme de *C. albicans* da resina acrílica.

A partir da obtenção dos 500 µL da suspensão fúngica, foram realizadas diluições seriadas em PBS, obtendo-se diluições entre 10^{-1} a 10^{-4} desta suspensão. Alíquotas de 25 µL de cada diluição foram plaqueadas em duplicatas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco®, Detroit, Michigan, EUA) com cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Encerrado o período de incubação, procedeu-se a contagem das colônias de microrganismos das diluições que originaram de 20 a 200 unidades formadoras de colônias (UFC) com características de leveduras do gênero *Candida*. A seguir, estes valores transformados para número de unidades formadoras de colônias por mililitro UFC/ml. Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, $q = 0,025$ já que foram pipetados 25 μL para cada diluição. A mediana das 2 placas de cada corpo-de-prova foi utilizada como valor final de contagem. Os valores médios de cada grupo foram devidamente catalogados para posterior avaliação estatística.

As etapas supracitadas estão ilustradas a seguir na Figura 11.

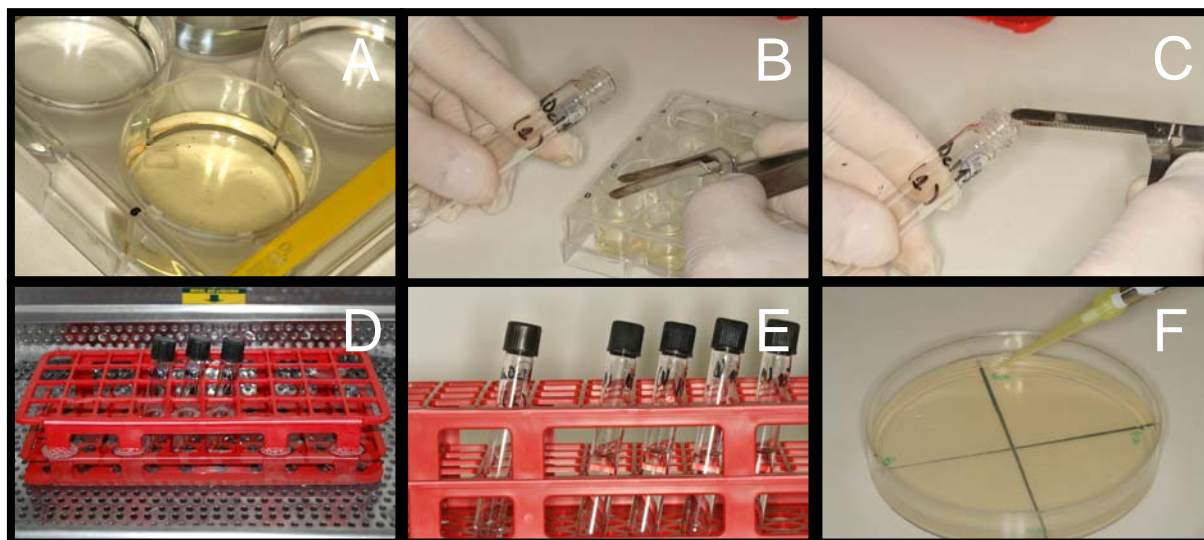


Figura 11: Processamento dos corpos-de-prova para cultura microbiológica. Após a desinfecção, cada corpo-de-prova foi deixado por 48 horas em TSB para que houvesse sua recuperação **(A)**. Cessado esse período, cada corpo-de-prova foi retirado do poço da placa de cultura e colocado em tubo de ensaio, contendo 500 μL de PBS **(B – C)**. O tubo de ensaio foi imerso em aparelho ultrassom por 20 minutos para separação do biofilme de *C. albicans* da resina acrílica **(D)**. A partir da obtenção da suspensão de microrganismos, deste conteúdo foram realizadas diluições seriadas em PBS, obtendo-se diluições entre 10^{-1} a 10^{-4} **(E)**. Alíquotas de 25 μL de cada diluição foram plaqueadas em duplicatas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol **(F)**.

3.4 Análise do efeito das soluções desinfetantes sobre as *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através do microscópio confocal e do MEV

Concomitantemente a análise da viabilidade das células do biofilme, o microscópio confocal permitiu a observação do comportamento das células fúngicas do biofilme frente às soluções testadas.

Porém, a fim de possibilitar a exploração desta análise com maior resolução, 3 novos corpos-de-prova de cada grupo foram destinados à análise por meio do MEV.

3.4.1 Desinfecção dos corpos-de-prova para análise em MEV

A desinfecção dos corpos-de-prova procedeu-se de maneira idêntica a adotada para microscopia confocal (item 3.3.1.1), com exceção que, para esta análise, cada grupo conteve apenas 3 corpos-de-prova.

3.4.2 Processamento dos corpos-de-prova para MEV

Após a lavagem em PBS, os corpos-de-prova foram encaminhados para fixação em vapor de tetróxido de ósmio (KITAJIMA e LEITE, 1997). Em capela de exaustão de gases, cada corpo-de-prova foi depositado sobre uma lâmina de vidro dentro de uma placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido (câmara úmida). A seguir, foi coletado 1 mL de tetróxido de ósmio a 2% e colocado em uma tampinha de refrigerante que, por sua vez, também foi colocada dentro da placa de Petri. Imediatamente, a placa de Petri foi envolvida com papel alumínio, permanecendo dentro da capela por 48 horas. Ao volatilizar, o tetróxido de ósmio promoveu a fixação dos microrganismos presentes em biofilmes sobre os corpos de prova. Após

a fixação, a lâmina de vidro com cada corpo-de-prova foi transferida para um dessecador com sílica-gel, onde permaneceu por 3 horas.

Por fim, foi realizada a montagem dos corpos-de-prova em *stubs* com auxílio de fita adesiva e, na seqüência, foram metalizados (Hammer VII, Alexandria) e analisados em MEV (JEOL T 220-A, Japão).

As etapas citadas estão ilustradas a seguir na Figura 12.

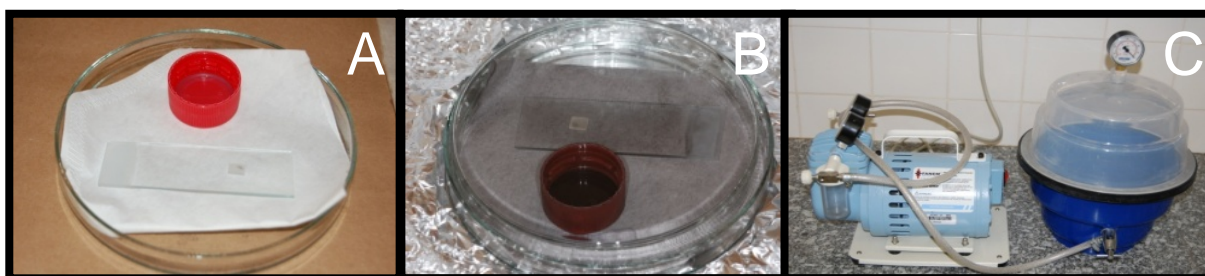


Figura 12: Processamento dos corpos-de-prova para MEV. Na capela, cada corpo-de-prova foi depositado sobre uma lâmina de vidro dentro de uma placa de Petri, forrada com papel de filtro umedecido, junto a uma tampinha de refrigerante com 1 mL de tetróxido de ósmio a 2%. Imediatamente, a placa de Petri foi envolvida com papel alumínio, permanecendo dentro da capela por 48 horas **(A)**. Aspecto enegrecido dos materiais presentes dentro da placa de Petri, característico do processo de fixação com o tetróxido de ósmio **(B)**. Após a fixação, a lâmina de vidro com cada corpo-de-prova foi transferida para uma câmara de sílica para dessecação por 3 horas **(C)**.

3.4.3 Análise dos corpos-de-prova através do MEV

A aquisição das imagens foi realizada de maneira padronizada e idêntica a seqüência de aquisição das imagens adotada para microscopia confocal (item 3.3.1.3). Para a localização de cada campo, foi utilizado um aumento de 50 vezes. Aumentos maiores de até 2.000 vezes foram utilizados para exploração dos detalhes da superfície da resina acrílica, do biofilme e da morfologia das células fúngicas.

3.5 Análise estatística

Os valores médios obtidos pela cultura microbiológica e pelo microscópio confocal, relativos ao desempenho das soluções desinfetantes avaliadas sobre *C. albicans* presentes em biofilme sobre resina acrílica, foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste Student-Newman-Keuls para as comparações múltiplas entre os grupos, com nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$).



4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise do efeito das soluções desinfetantes nas *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através do microscópio confocal e do MEV

Para a análise do efeito das soluções desinfetantes nas *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável, através do microscópio confocal, foram utilizados 6 corpos-de-prova de cada grupo, sendo que de cada corpo-de-prova foram adquiridas 6 imagens de diferentes campos do biofilme. Já para a análise em MEV, foram preparados 3 corpos-de-prova de cada grupo.

4.1.1 Grupo controle

A análise através do microscópio confocal e do MEV dos corpos-de-prova tratados com água destilada demonstrou a presença de um elevado número de *C. albicans* sobre a resina acrílica termopolimerizável. Na maioria dos campos analisados no microscópio confocal, as células fúngicas remanescentes se apresentaram dispersas na forma cilíndrica ou oval, típica de levedura (fungos leveduriformes), enquanto que, através do MEV, as células fúngicas remanescentes se apresentaram dispersas, tanto na forma de levedura, quanto na forma tubular ou filamentosa, típica de hifa (fungos filamentosos) (Figura 13 e 14).

Além disso, através do MEV, foi evidenciado que em ambas as formas celulares não foram notadas alterações morfológicas causadas pelo tratamento com água destilada (Figura 14).

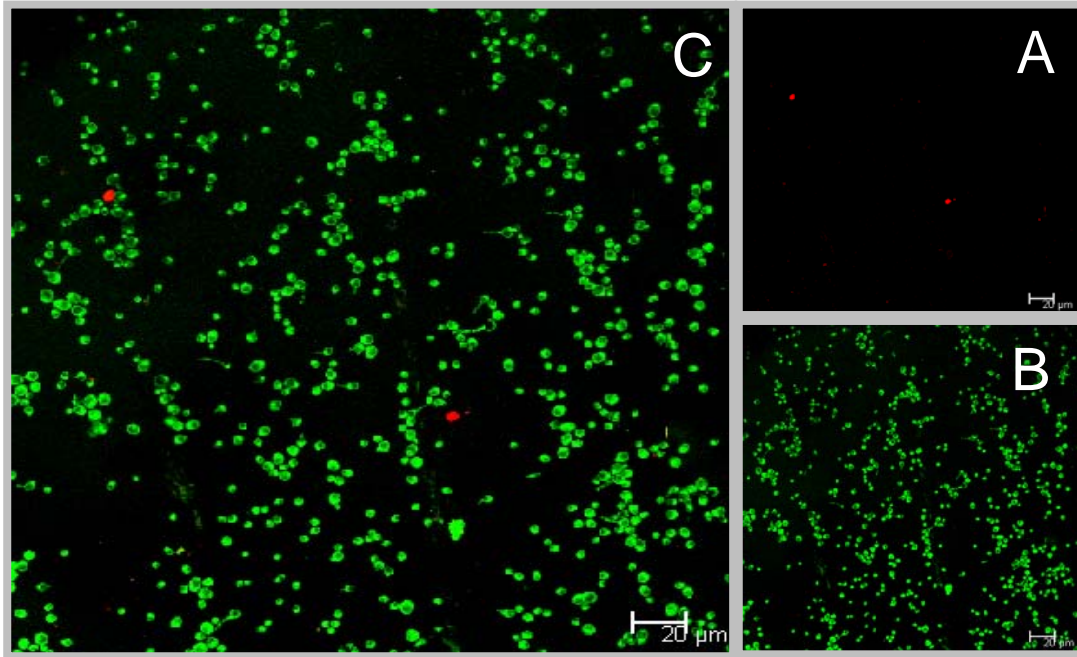


Figura 13: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável tratado com água destilada por 10 minutos (grupo controle) através do microscópio confocal. Imagem adquirida para identificação do SYTO-9 no interior das células fúngicas (A). Imagem adquirida para identificação do iodeto de propídeo no interior das células fúngicas (B). Sobreposição das imagens. Células fúngicas dispersas na forma de leveduras (C).

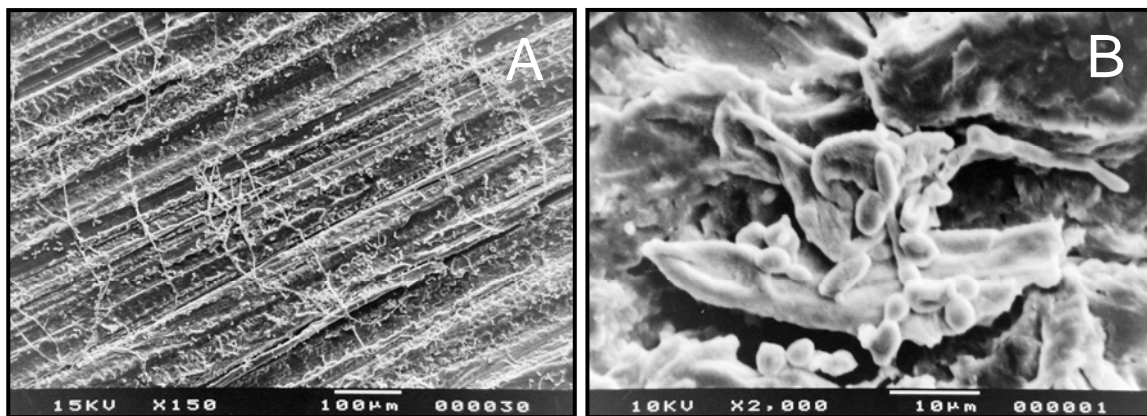


Figura 14: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável tratado com água destilada por 10 minutos (grupo controle) através do MEV. Células fúngicas remanescentes dispersas na forma de leveduras e de hifas após o processo de desinfecção (150 x de aumento) (A). Células fúngicas sem alterações morfológicas (2000 x de aumento) (B).

4 Resultados

4.1.2 Solução de gluconato de clorexidina a 4%

A análise através do microscópio confocal e do MEV dos corpos-de-prova desinfetados através da solução de gluconato de clorexidina a 4% demonstrou a presença de elevado número de *C. albicans* sobre a resina acrílica termopolimerizável. Na maioria dos campos analisados no microscópio confocal, as células fúngicas remanescentes se apresentaram aglomeradas na forma de levedura, enquanto que, através do MEV, as células fúngicas remanescentes se apresentaram aglomeradas, tanto na forma de levedura, quanto na forma de hifa (Figuras 15 e 16).

Também através do MEV, em ambas as formas celulares não foram notadas alterações morfológicas causadas pela solução de gluconato de clorexidina a 4% (Figura 16).

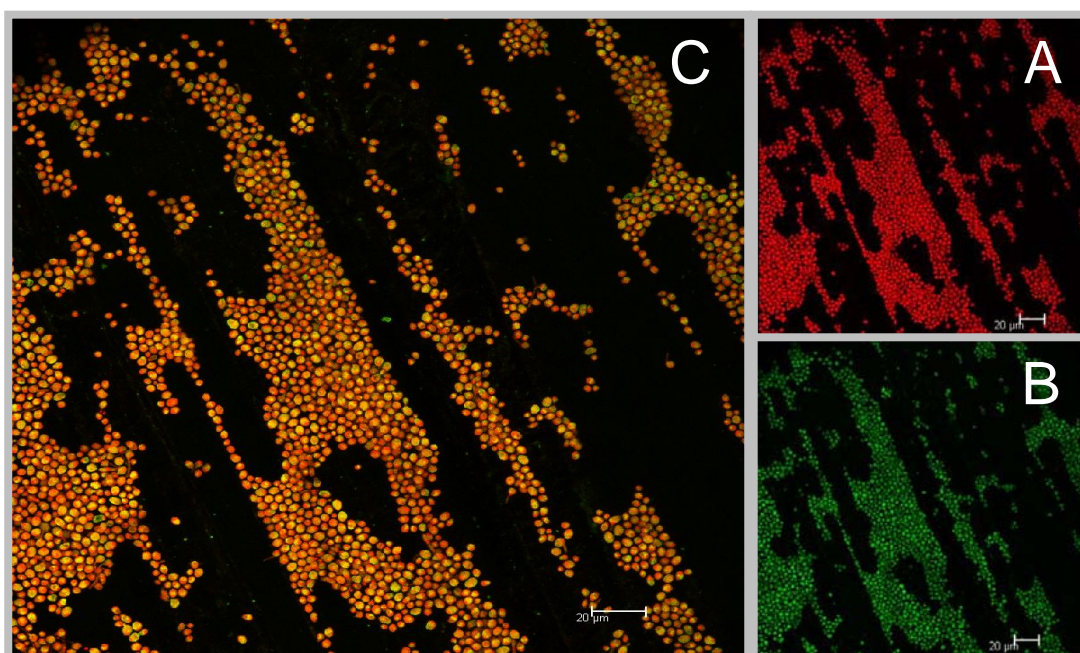


Figura 15: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de gluconato de clorexidina a 4% por 10 minutos através do microscópio confocal. Imagem adquirida para identificação do SYTO-9 no interior das células fúngicas (A). Imagem adquirida para identificação do iodeto de propídeo no interior das células fúngicas (B). Sobreposição das imagens. Células fúngicas aglomeradas na forma de leveduras (C).

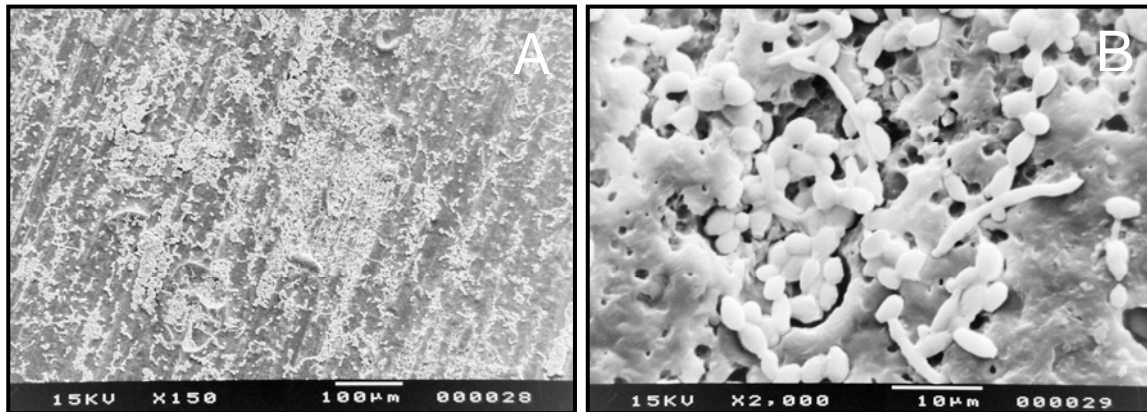


Figura 16: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de gluconato de clorexidina a 4% por 10 minutos através do MEV. Células fúngicas remanescentes aglomeradas na forma de leveduras e de hifas após o processo de desinfecção (150 x de aumento) **(A)**. Células fúngicas sem alterações morfológicas (2000 x de aumento) **(B)**.

4.1.3 Solução de hipoclorito de sódio a 1%

A análise através do microscópio confocal e do MEV dos corpos-de-prova desinfetados através da solução de hipoclorito de sódio a 1% revelou pequeno número de *C. albicans* na superfície da resina acrílica termopolimerizável. Apesar do número reduzido, as células fúngicas remanescentes se apresentaram tanto na forma de levedura, quanto de hifa (Figuras 17 e 18).

Ademais, através do MEV, em ambas as formas celulares foram notadas alterações morfológicas causadas pela solução de hipoclorito de sódio a 1% (Figura 18).

4 Resultados

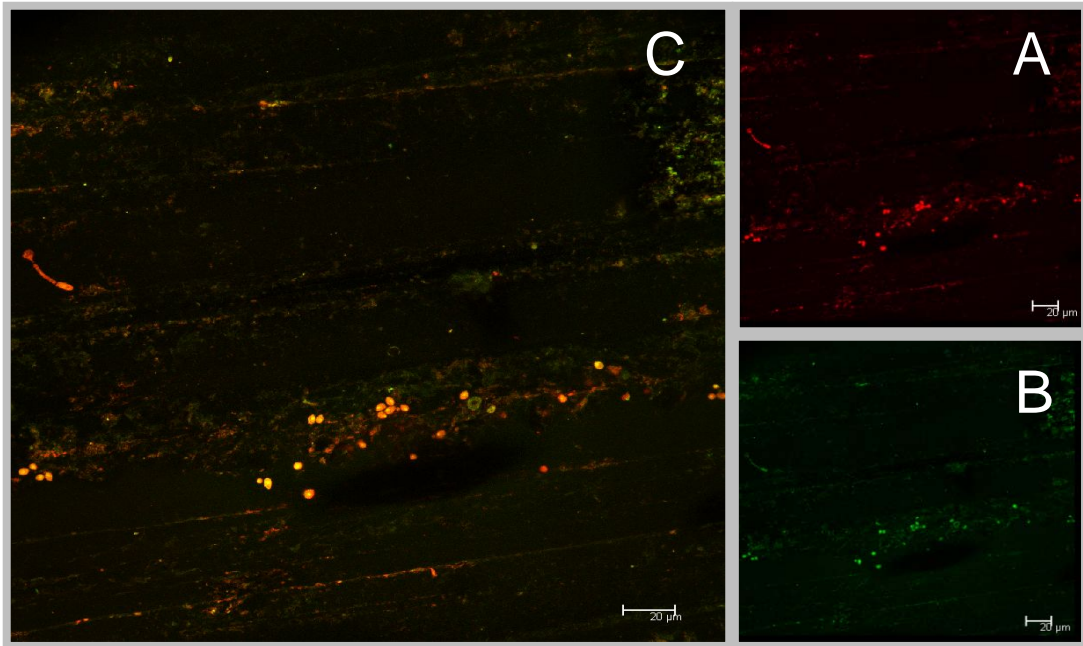


Figura 17: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos através do microscópio confocal. Imagem adquirida para identificação do SYTO-9 no interior das células fúngicas (A). Imagem adquirida para identificação do iodeto de propídeo no interior das células fúngicas (B). Sobreposição das imagens. Células fúngicas remanescentes na forma de levedura e de hifa (C).

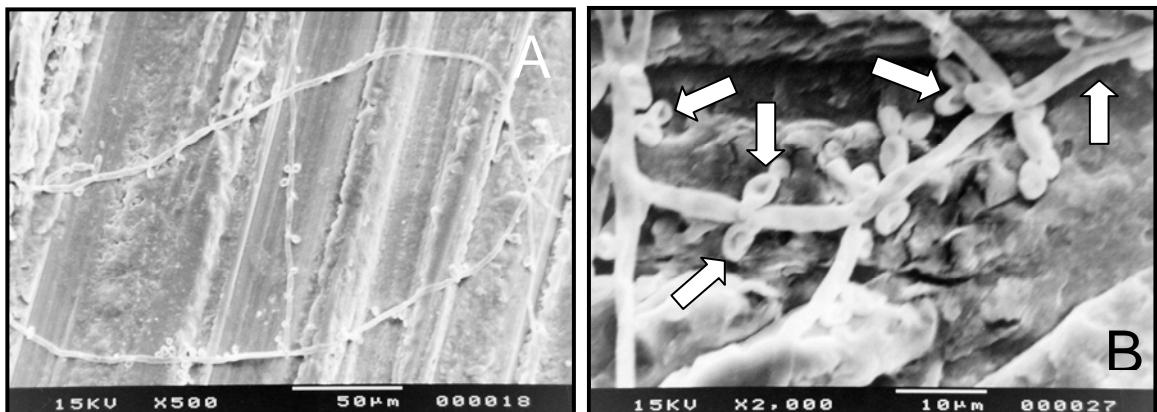


Figura 18: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos através do MEV. Pequeno número de células remanescentes apresentando tanto a forma de levedura, quanto de hifa na superfície da resina acrílica termopolimerizável (500 x de aumento) (A). As setas indicam leveduras e hifas com alterações morfológicas (2000 x de aumento) (B).

4.1.4 Solução de hipoclorito de sódio a 2%

A análise através do microscópio confocal dos corpos-de-prova desinfetados através da solução de gluconato de clorexidina a 4% demonstrou a presença de reduzido número de *C. albicans* sobre a resina acrílica termopolimerizável em apenas 2 dos 6 corpos-de-prova deste grupo. Todas as células fúngicas remanescentes se apresentaram na forma de levedura. Porém, nos demais corpos-de-prova deste grupo não foram identificados microrganismos na superfície da resina acrílica termopolimerizável (Figura 19).

A análise em MEV dos corpos-de-prova desinfetados através da solução de hipoclorito de sódio a 2% revelou ausência de microrganismos na superfície da resina acrílica termopolimerizável (Figura 20).

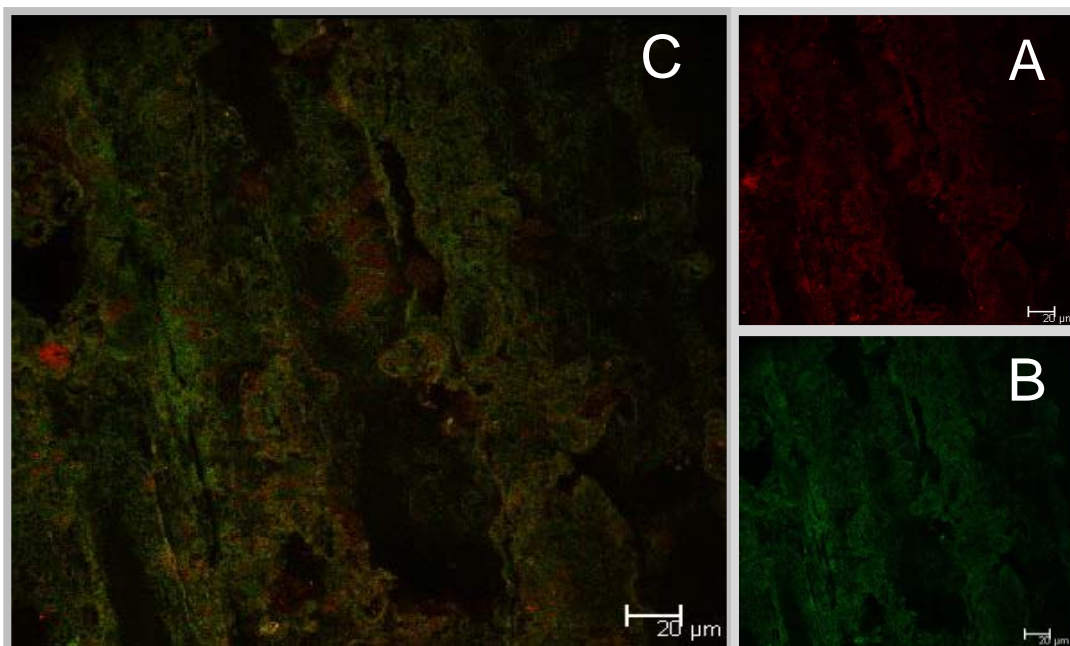


Figura 19: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos através do microscópio confocal. Imagem adquirida para identificação do SYTO-9 no interior das células fúngicas (A). Imagem adquirida para identificação do iodeto de propídeo no interior das células fúngicas (B) Sobreposição das imagens. Nenhuma célula fúngica foi identificada na maioria dos corpos-de-prova (C).

4 Resultados

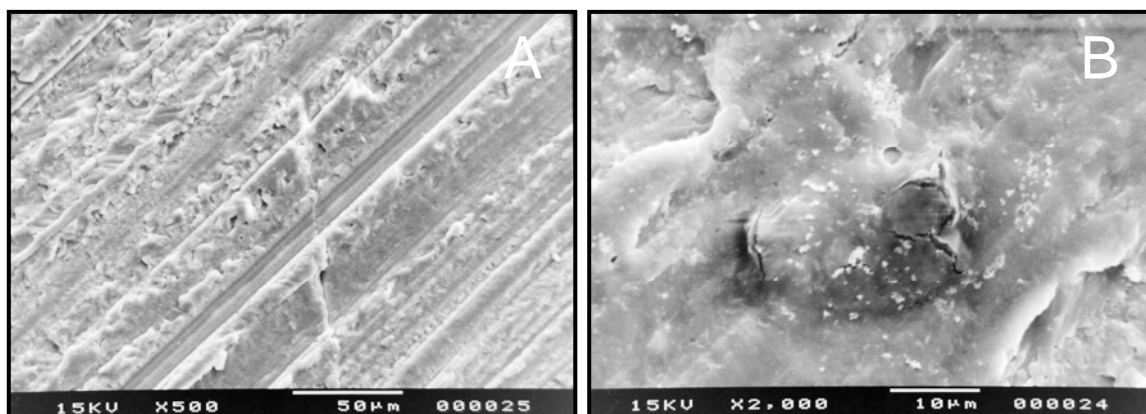


Figura 20: Imagens do biofilme de *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável após a desinfecção com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos através do MEV. Ausência de microrganismos sobre os corpos-de-prova de resina acrílica termopolimerizável com 500 x de aumento (A) e com 2000 x de aumento (B).

4.2 Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através do microscópio confocal

A partir das mesmas imagens adquiridas pelo microscópio confocal e utilizadas na observação dos efeitos das soluções desinfetantes nas *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável, foi feita a análise do efeito destas substâncias na viabilidade destes microrganismos.

Para tal, essas imagens foram visualizadas através do programa Image J, onde foi realizada a contagem por campo do número de microrganismos viáveis (células em verde) e não viáveis (célula em vermelho), assim como o número total de células remanescentes de cada grupo de desinfecção.

Com base na análise das imagens, foi possível observar que no grupo controle, o número de células viáveis variou entre os 6 campos analisados de cada amostra de 296 a 3.248, enquanto que nos grupos gluconato de clorexidina a 4% e hipoclorito de sódio a 1% e 2% não foi observada nenhuma célula viável. No grupo controle, o número de células não viáveis variou entre os 6 campos analisados de cada amostra de 0 a 126, no grupo gluconato de clorexidina a 4% variou de 81 a 2.329, no grupo hipoclorito de sódio a 1% de sódio variou de 0 a 41 e no grupo

4 Resultados

hipoclorito de sódio a 2% de 0 a 18. O número total de células remanescentes no grupo controle foi de 41.620, no grupo gluconato de clorexidina a 4% foi de 41.805, no grupo hipoclorito de sódio a 1% foi de 175 e no grupo hipoclorito de sódio a 2% foi de 76.

A tabela 2 representa a média e o desvio-padrão do número de células viáveis, células não viáveis e total de células de cada grupo.

Tabela 2 – Média e desvio-padrão de células viáveis, não viáveis e total de células remanescentes para os grupos avaliados e número de corpos-de-prova por grupo.

Grupos	Células Viáveis		Células Não viáveis		Total de Células		Número
	Média	D.P.	Média	D.P.	Médias	D.P.	
G1	1133,69	656,49	22,42	43,09	1156,11	649,27	6
G2	0	0	1161,25	667,64	1161,25	667,64	6
G3	0	0	4,86	4,72	4,86	4,72	6
G4	0	0	2,11	2,37	2,11	2,37	6

G1: Grupo controle; G2: Gluconato de clorexidina a 4%; G3: Hipoclorito de sódio a 1%; G4: Hipoclorito de sódio a 2%; D.P.: Desvio Padrão

Para o número de células viáveis, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0001$). Após a aplicação deste teste, foi realizada a comparação entre as soluções testadas, através do teste Student-Newman-Keuls, a fim de determinar entre quais soluções houve diferença estatisticamente significativa.

Na tabela 3 estão apresentadas as comparações, pelo teste Student-Newman-Keuls, das médias de células viáveis, obtidas de cada solução desinfetante testada.

4 Resultados

Tabela 3 – Comparações entre as médias de células viáveis para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.

Grupos	Média	Média	Significância
G1 x G2	1133,69	0	Significante
G1 x G3	1133,69	0	Significante
G1 x G4	1133,69	0	Significante
G2 x G3	0	0	Não significante
G2 x G4	0	0	Não significante
G3 x G4	0	0	Não significante

G1: Grupo controle; G2: Gluconato de clorexidina a 4%; G3: Hipoclorito de sódio a 1%; G4: Hipoclorito de sódio a 2%. Diferenças estatísticas em função de $p < 0,05$.

Para o número de células não viáveis, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0018$). Após a aplicação deste teste, foi realizada a comparação entre as soluções testadas, através do teste Student-Newman-Keuls, a fim de determinar entre quais soluções houve diferença estatisticamente significativa.

Na tabela 4 estão apresentadas as comparações, pelo teste Student-Newman-Keuls, das médias de células não viáveis, obtidas de cada solução desinfetante testada.

4 Resultados

Tabela 4 – Comparações entre as médias de células não viáveis para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.

Grupos	Média	Média	Significância
G1 x G2	22,42	1161,25	Significante
G1 x G3	22,42	4,86	Não Significante
G1 x G4	22,42	2,11	Não Significante
G2 x G3	1161,25	4,86	Significante
G2 x G4	1161,25	2,11	Significante
G3 x G4	4,86	2,11	Não significativa

G1: Grupo controle; G2: Gluconato de clorexidina a 4%; G3: Hipoclorito de sódio a 1%; G4: Hipoclorito de sódio a 2%. Diferenças estatísticas em função de $p < 0,05$.

Para o número total de células remanescentes, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0005$). Após a aplicação deste teste, foi realizada a comparação entre as soluções testadas, através do teste Student-Newman-Keuls, a fim de determinar entre quais soluções houve diferença estatisticamente significativa.

Na tabela 5 estão apresentadas as comparações, pelo teste Student-Newman-Keuls, das médias do número total de células remanescentes, obtidas de cada solução desinfetante testada.

4 Resultados

Tabela 5 – Comparações entre as médias do número total de células remanescentes para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.

Grupos	Média	Média	Significância
G1 x G2	1156,11	1161,25	Não Significante
G1 x G3	1156,11	4,86	Significante
G1 x G4	1156,11	2,11	Significante
G2 x G3	1161,25	4,86	Significante
G2 x G4	1161,25	2,11	Significante
G3 x G4	4,86	2,11	Não significativa

G1: Grupo controle; G2: Gluconato de clorexidina a 4%; G3: Hipoclorito de sódio a 1%; G4: Hipoclorito de sódio a 2%. Diferenças estatísticas em função de $p < 0,05$.

4.3 Análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável através de cultura microbiológica

O efeito das soluções de gluconato de clorexidina a 4% e hipoclorito de sódio a 1% e 2% na viabilidade de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável também foi avaliada através do método clássico de contagem do número de UFC/mL, obtidas depois de 48 horas após o processo de desinfecção.

A tabela 6 representa a média e o desvio-padrão para número de UFC/mL de cada grupo.

4 Resultados

Tabela 6 – Médias e desvio padrão de UFC/mL para os diferentes grupos testados e número de corpos-de-prova por grupo.

Grupos	Média	D.P.	Número
G1	12. 10 ³	12,9	6
G2	0	0	6
G3	0	0	6
G4	0	0	6

G1: Grupo controle; G2: Gluconato de clorexidina a 4%; G3: Hipoclorito de sódio a 1%; G4: Hipoclorito de sódio a 2%; D.P.: Desvio Padrão

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a média de UFC/mL ($p < 0,0001$). Após a aplicação deste teste, foi realizada a comparação entre as soluções testadas, através do teste Student-Newman-Keuls, a fim de determinar entre quais soluções houve diferença estatisticamente significativa.

Os resultados alcançados demonstraram que na ausência de solução desinfetante (controle), verificou-se que o número de unidades formadoras de colônias por mL variou de $8,4 \cdot 10^3$ a $16,4 \cdot 10^3$. Por outro lado, nos demais grupo não foi observado crescimento fúngico.

Na tabela 7 estão apresentadas as comparações, pelo teste Student-Newman-Keuls, das médias de UFC/mL, obtidas de cada solução desinfetante testada.

4 Resultados

Tabela 7 – Comparações entre as médias de UFC/mL para os diferentes grupos avaliados e significância estatística.

Grupos	Média	Média	Significância
G1 x G2	12. 10 ³	0	Significante
G1 x G3	12. 10 ³	0	Significante
G1 x G4	12. 10 ³	0	Significante
G2 x G3	0	0	Não significante
G2 x G4	0	0	Não significante
G3 x G4	0	0	Não significante

G1: Grupo controle; G2: Gluconato de clorexidina a 4%; G3: Hipoclorito de sódio a 1%; G4: Hipoclorito de sódio a 2%. Diferenças estatísticas em função de $p < 0,05$.



5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como propósito, de forma inédita, analisar o efeito das soluções desinfetantes utilizadas na viabilidade, na remoção e na morfologia de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resinas acrílicas termopolimerizáveis através do microscópio confocal, de cultura microbiológica e do MEV.

Apesar da vasta literatura a respeito da utilização das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio na desinfecção de próteses totais, limitadas informações estão disponíveis a respeito do efeito destas soluções sobre *C. albicans* sobre resina acrílica termopolimerizável na forma de biofilmes, onde estes microrganismos se encontram agregados e com avantajada resistência aos agentes antimicrobianos.

Essa análise é de fundamental importância, pois como a maior parte das prescrições de antimicrobianos no controle dos biofilmes sobre as próteses removíveis é feita com base em estudos em células em suspensão, as quantidades utilizadas destas substâncias podem ser inferiores às necessárias para eliminar biofilmes. Deste modo, o uso generalizado de terapias antimicrobianas no combate às infecções provocadas por fungos, como a estomatite por prótese total, pode favorecer o surgimento de novas espécies cada vez mais resistentes aos antimicrobianos vulgarmente utilizados.

5.1 Da metodologia

Em relação à metodologia aplicada neste estudo, alguns fatores merecem ser esclarecidos.

Embora o biofilme sobre dentaduras seja formado por inúmeros microrganismos (NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998), avaliamos apenas o efeito das soluções desinfetantes sobre *C. albicans*, em função desses microrganismos serem os que mais comumente contaminam estas próteses, assim como por serem considerados, pela maioria dos autores, o principal agente

etiológico da estomatite por prótese total (ARENDORF e WALKER, 1987; NIKAWA, HAMADA e YAMAMOTO, 1998).

Para que o hipoclorito de sódio e clorexidina, em baixas concentrações, sejam efetivos na desinfecção de próteses totais, necessita-se de um maior período de ação. A extensão no período que o paciente ficará sem prótese na boca durante a desinfecção pode se tornar inconveniente. Por isso, assim como em vários trabalhos na literatura (DEPAOLA, MINAH e ELIAS, 1984; RUDD et al., 1984; BELL et al., 1989; KULAK, ARIKAN e DELIBALTA, 1994; CHAU et al., 1995; KULAK et al., 1997; MEILLER et al., 1999; SESMA et al., 1999; PAVARINA et al., 2003; BUERGERS et al., 2008; DA SILVA et al., 2008), nosso estudo utilizou estas soluções desinfetantes em concentrações mais elevadas, garantindo a desinfecção das próteses totais em um curto período de tempo. Porém, especificamente para as soluções de hipoclorito de sódio, apesar da sua eficácia antimicrobiana a 5,25%, evidências comprovam que o seu emprego na desinfecção das próteses removíveis ocasiona uma série de efeitos deletérios ao seu material, tais como: descoloração (RUDD et al., 1984) e redução na resistência flexural da resina acrílica, corrosão do das ligas de cobalto-cromo e odor e gosto desagradável (PAVARINA et al., 2003). Portanto, durante essa pesquisa foram utilizadas soluções de hipoclorito em concentrações intermediárias (1% e 2%), as quais proporcionam um rápido efeito antimicrobiano, não causam corrosão de metal durante 5 minutos (PAVARINA et al., 2003) e não alteram a coloração de corpos-de-prova de resina acrílica após 72 horas de imersão (MCNEME, VON GONTEN e WOOLSEY, 1991).

A utilização de corpos-de-prova em resina acrílica termopolimerizável transparente e com de dimensões reduzidas (5 x 5 x 1 mm) ocorreu a fim de possibilitar a análise do efeito das soluções desinfetantes sobre *C. albicans* em biofilmes sobre resina acrílica através do microscópio confocal. Durante esta análise, os corpos-de-prova foram adaptados a uma lamínula de vidro, limitando, assim, a largura e comprimento dos mesmos. A espessura e a transparência dos corpos-de-prova foram determinadas com o intuito de não haver a interferência na passagem do laser do microscópio confocal, e estão em consonância com trabalhos de semelhante metodologia (LAMFON et al., 2003; PEREIRA-CENCI et al., 2008),

Ainda sobre os corpos-de-prova, este estudo utilizou corpos-de-prova com rugosidade superficial média entre 1 e 2 μm , com o propósito de reproduzir (baseado em estudo piloto) rugosidade compatível com certas áreas da prótese total críticas

para o polimento, como a superfície interna (PHILLIPS, 1986). Com isso, facilitou-se a adesão das *C. albicans* à superfície da resina acrílica. Segundo Donlan (2001), bactérias, fungos e outros microrganismos têm tendência natural de se aderir e colonizar as superfícies como mecanismo de sobrevivência. Este processo de adesão pode ser influenciado por fatores microbiológicos, físicos, químicos e relacionados ao material (BOLLEN, LAMBRECHTS e QUIRYNEN, 1997). No que tange aos fatores relacionados à resina acrílica, a rugosidade superficial tem sido largamente estudada, uma vez que ranhuras ou fendas na superfície deste material conferem proteção às células contra tensões de corte, permitindo que a adesão seja estabelecida mais facilmente, sendo, por isso, locais preferenciais para a colonização inicial. Além disso, as irregularidades da superfície contribuem para um aumento da área superficial disponível para a adesão (QUIRYNEN e BOLLEN, 1995).

Para a contaminação dos corpos-de-prova, optou-se pela padronização do inóculo fúngico em 1.10^7 cel/mL, uma vez que, segundo Chandra et al. (2001b), esta é a concentração ideal para formação dos biofilmes de *C. albicans*. Contudo, observa-se na literatura uma grande variação na concentração do inóculo microbiano empregado nos ensaios de desinfecção sobre resinas acrílicas, o que pode explicar divergências entre alguns resultados encontrados, pois uma concentração microbiana elevada pode favorecer uma contaminação mais intensa e extensa da superfície da resina acrílica, influenciando na ação das substâncias antimicrobianas avaliadas.

Os resultados obtidos, em nosso estudo, através de microscopia confocal demonstraram que o período de 24 horas foi adequado para promover a formação do biofilme sobre os corpos-de-prova. Este período foi estabelecido, pois seria o período máximo em que as próteses totais podem ser utilizadas sem que o usuário realize a sua higienização. Além disso, neste período houve a formação de biofilmes pouco espessos (10 a 30 μ m), o que assegurou a total difusão dos fluorocromos pelo biofilme e, principalmente, permitiu, após a aquisição das imagens no microscópio confocal, a contagem dos microrganismos sobre a superfície da resina acrílica de forma individual através do programa ImageJ.

Como todo estudo *in vitro*, o presente trabalho também apresentou limitações, sendo que a principal delas foi a ausência do fluxo salivar, importante no controle do acúmulo de placa microbiana. Assim, a fim de minimizar essa limitação,

os corpos-de-prova foram mantidos sob agitação constante durante todo o período em que permaneceram nos poços das placas sob cultura. Desta forma, evitou-se o acúmulo das células fúngicas nos corpos-de-prova por deposição e não por aderência. Além disso, de acordo com Thein, Samaranayake e Samaranayake (2007), há uma maior formação de biofilme de *C. albicans* em ambiente dinâmico do que em meio estático.

A remoção do biofilme dos corpos-de-prova para análise através de cultura microbiológica foi realizada através de ultrassom. A utilização deste aparelho com este propósito é evidenciada em outros trabalhos na literatura (WEBB et al., 1998a; DONLAN e COSTERTON, 2002; MUKHERJEE et al., 2003). Estes aparelhos convertem energia elétrica em energia mecânica, em frequência de ondas sonoras. Essas vibrações induzem à rápida formação e colapso de bolhas microscópicas, as quais produzem uma alta energia que resulta em choques hidráulicos. Esses choques constituem-se na ação de limpeza dos resíduos da superfície de objetos submersos no líquido contido no interior do aparelho (ABELSON, 1981). Outros métodos, como a raspagem dos corpos-de-prova através de lâminas de bisturi, poderiam ser aplicados na remoção do biofilme, no entanto, acreditamos que este procedimento seja de difícil padronização, bem como poderia comprometer a integridade e viabilidade das células do biofilme.

O método de cultura microbiológica foi escolhido, pois a literatura reporta que tradicionalmente a eficácia de agentes antimicrobianos, como as soluções desinfetantes, no controle da formação de biofilmes tem sido avaliada com base na contagem de UFC em placa de Petri contendo meio de crescimento em ágar, após o processo de desinfecção. Contudo, este método apresenta alguns inconvenientes, pois, além de ser um método relativamente lento (MILLARD et al., 1997), a capacidade de crescimento dos microrganismos num determinado meio de cultura pode não refletir a sua atividade ou viabilidade no ambiente de onde foram removidas (MCFETERS et al., 1995). Deste modo, os microrganismos expostos aos agentes antimicrobianos podem perder a capacidade de formação de colônias em placa de ágar, continuando, no entanto, a exibir significativa atividade metabólica. Assim, ao subestimar as populações microbianas expostas a essas substâncias, o potencial antimicrobiano dos agentes antimicrobianos acaba sendo erradamente superestimado (STEWART et al., 1994).

A partir destas constatações, foi observada a necessidade da análise do efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes nas células fúngicas em biofilmes, a partir de outro método que fosse capaz de julgar a viabilidade das células fúngicas, sem levar em consideração o seu crescimento em cultura.

A literatura tem demonstrado freqüentemente a utilização do fluorocromo FUN-1 com esse propósito (MILLARD et al., 1997; CHANDRA et al., 2001a; KUHN et al., 2002). Através deste, as células fúngicas metabolicamente não ativas (não viáveis) emitem uma coloração fluorescente difusa verde-amarelada, enquanto que nas células metabolicamente ativas (viáveis), o FUN-1 é convertido em estruturas cilíndricas intravacuolares de coloração laranja-avermelhada, fazendo com que estas células emitam esta mesma coloração (MILLARD et al., 1997). Entretanto, o FUN-1 pode provocar a formação de múltiplas estruturas cilíndricas intravacuolares nas células metabolicamente ativas na forma de hifas, possibilitando a superestimação do número de células viáveis quando a densidade celular é elevada no biofilme. Deste modo, o FUN-1 não é ideal para a avaliação da viabilidade celular de biofilmes fúngicos (JIN et al., 2005).

Portanto, o presente estudo optou pela análise do efeito das soluções desinfetantes na viabilidade de *C. albicans* nos biofilmes através dos fluorocromos SYTO-9 e iodeto de propídeo no microscópio confocal. Esta técnica ofereceu como vantagem ser um processo rápido (completa-se em menos de 20 minutos), quando comparado com os tradicionais testes de cultura celular em placa, pois estes geralmente requerem, no mínimo, 24 horas de incubação. Além disso, esses fluorocromos determinam a viabilidade celular pela integridade da membrana citoplasmática celular (JIN et al., 2005), e não pelo seu estado metabólico ou crescimento, tornando, assim, essa determinação mais precisa.

De forma complementar, a análise dos corpos-de-prova em MEV teve como intuito demonstrar, através da sua alta resolução, as alterações ocorridas tanto de forma geral no biofilme, quanto em cada um de seus microrganismos constituintes, após o tempo de contato com as soluções desinfetantes testadas. Neste estudo, os biofilmes presentes nos corpos-de-prova foram fixados através de vapor de tetróxido de ósmio conforme preconizado por Kitajima e Leite (1997), em vez da utilização do método típico de preparação de amostras para MEV (fixação com uma solução de glutaraldeído 3% (V/V) preparada com 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 durante 24 horas à temperatura ambiente, antes da desidratação pelas soluções de

etanol). Desta forma, evitou-se um efeito antimicrobiano adicional do glutaraldeído sobre o biofilme, uma vez que, segundo Azeredo, Lazarova e Oliveira (1999), o glutaraldeído pode perturbar a estrutura da matriz polimérica e conseqüentemente alterar a arquitetura do biofilme.

5.2 Dos resultados

5.2.1 Dos resultados obtidos através do microscópio confocal e do MEV

Durante a análise das imagens para a determinação da viabilidade das *C. albicans* nos biofilmes sobre os corpos-de-prova através da microscopia confocal, foi seguido o parâmetro utilizado por JIN et al. (2005) com modificações. Segundo este autor, quando usado isoladamente, o fluorocromo SYTO-9 penetra tanto em células viáveis, quanto em não viáveis, pigmentando-as de verde. Em contraste, o iodeto de propídeo penetra somente em microrganismos não viáveis, com membrana comprometida, tornando-os vermelhos. Uma vez utilizados simultaneamente em microrganismos não viáveis, ambos os fluorocromos penetrarão, porém quem determinará a cor destes será o iodeto de propídeo, pois o mesmo tem a capacidade de reduzir a coloração verde oferecida pelo SYTO-9, lhes proporcionando uma coloração avermelhada. No presente estudo, este comportamento foi confirmado apenas no grupo controle, onde a imagem adquirida para a identificação do SYTO-9 demonstrou as células viáveis em verde, enquanto a imagem adquirida para a identificação do iodeto de propídeo demonstrou as células não viáveis em vermelho. Porém, nos demais grupos submetidos à desinfecção, a identificação das células não viáveis foi determinada fundamentalmente na premissa de que a presença do iodeto de propídeo no interior das células é o indicativo de morte celular, pois nestes grupos também houve a entrada de ambos os fluorocromos nas células não viáveis remanescentes, contudo não foi observada a redução do SYTO-9 pelo iodeto de propídeo. Como conseqüência, uma mesma célula foi observada nas duas imagens, tanto na referente à identificação do SYTO-9 (célula em verde), como na referente à identificação do iodeto de propídeo (célula em vermelho). Deste modo, ao se

sobrepostas as duas imagens de cada campo da amostra, as células apresentaram a coloração amarelo-avermelhadas. Assim, esta coloração serviu como parâmetro na identificação das células não viáveis. Uma suposição para a diferença de coloração encontrada, neste estudo, no comportamento dos fluorocromos pode estar relacionada a uma possível interferência das soluções desinfetantes sobre o iodeto de propídeo, diminuindo a sua capacidade redutora frente ao SYTO-9.

A análise através do microscópio confocal e do MEV dos corpos-de-prova desinfetados através da solução de gluconato de clorexidina a 4% demonstrou que não houve a redução no número total de células do biofilme sobre a resina após a desinfecção, quando comparado ao grupo controle (Figuras 15 e 16). Por outro lado, após o contato com esta substância, a configuração do biofilme substancialmente se modificou. Em linhas gerais, houve uma maior agregação entre as células fúngicas, com a formação de aglomerados celulares, não obstante algumas estarem presentes de forma dispersa (Figuras 15 e 16). Estes achados podem ser interpretados como um mecanismo de defesa destas células frente às soluções desinfetantes.

Do total das células remanescentes da desinfecção pela solução de gluconato de clorexidina, todas se apresentaram não viáveis.

Segundo Chandra et al. (2001a) e Chandra et al. (2001b), as células fúngicas exibem, *in vitro*, níveis de resistência fenotípica à clorexidina quando se encontram em biofilmes. A organização do biofilme tem sido relatada como uma forma de resistência aos agentes antimicrobianos, através de mecanismos, tais como: diminuição na taxa de crescimento e limitação de nutrientes e expressão de genes de resistência às drogas. Apesar dessas teorias, muito pouco ainda é sabido a respeito da eficácia de substâncias antimicrobianas na inativação de fungos como *C. albicans*. Em nosso estudo, a não resistência demonstrada pelas células fúngicas à clorexidina pode ser justificada pela quantidade inferior de células formadas no biofilme após 24 horas e pelo uso de clorexidina em maior concentração quando comparados aos estudos supracitados. Reforçando essa premissa, de acordo com Dolan (2001), a quantidade e a idade do biofilme influenciam diretamente na resistência dos microrganismos às substâncias antimicrobianas.

Ainda através do MEV, não foram notadas alterações morfológicas nas *C. albicans* causadas pela solução de gluconato de clorexidina a 4% (Figura 16). Porém, resultados diferentes foram encontrados por MacNeill et al. (1997) através

5 Discussão

desta mesma análise microscópica. Segundo estes autores, o digluconato de clorexidina a 0,12% promoveu profundas mudanças na morfologia destes microrganismos. A variação do efeito da clorexidina sobre a morfologia das *C. albicans*, entre estes estudos, pode estar relacionada com as diferentes concentrações da clorexidina utilizadas, pois, segundo Bobichon e Bouchet (1987) e Lopes, Siqueira Junior e Elias (1999), dependendo da sua concentração, a clorexidina pode apresentar dois efeitos distintos sobre os microrganismos. Em concentrações baixas, a clorexidina promove rompimento da parede celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático microbiano, o que justificaria as alterações morfológicas ocorridas nos microrganismos no estudo de MacNeill et al. Porém, em altas concentrações, a clorexidina não ocasiona mais o rompimento da parede celular e o extravasamento do conteúdo citoplasmático microbiano, o que justificaria a integridade morfológica dos microrganismos observada em nosso estudo.

Através das Figuras 17, 18, 19 e 20, demonstrou-se que as soluções de hipoclorito de sódio a 1% e 2% apresentaram grande poder de eliminação do biofilme sobre a resina, removendo mais de 90% do biofilme, sendo esta propriedade um dos fatores fundamentais na determinação da eficácia de uma solução higienizadora (NIKAWA et al., 1999). Corroborando com esses achados, outros estudos (KULAK et al., 1997; WEBB et al., 1998a; BUERGERS et al., 2008) também demonstraram, através do MEV, a grande capacidade removedora do hipoclorito de sódio sobre biofilmes formados sobre resina acrílica. Contudo, há de se levar em consideração as diferenças na metodologia nesses estudos, sobretudo com relação ao tamanho dos corpos-de-prova e às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Vale a pena ressaltar que a análise estatística não encontrou diferença significativa quando comparado o efeito removedor dos biofilmes das soluções de hipoclorito de sódio testadas neste estudo (Tabela 5).

Entre as poucas células remanescentes da desinfecção através destas soluções, todas se apresentaram não viáveis (Tabela 2). Além disso, através do MEV, nestas células foram notadas alterações morfológicas causadas pela solução de hipoclorito de sódio a 1%, semelhantes à invaginações, com dobras para o interior da célula (Figura 19). Tais alterações podem estar relacionadas ao efeito do hipoclorito de sódio na membrana e parede celular dos microrganismos. O hipoclorito de sódio é uma solução básica forte devido à presença dos íons OH.

Altas concentrações do íon OH podem alterar a integridade da parede e membrana celular dos microrganismos, através da degradação seus constituintes, tais como: mucopolissacarídeos, proteínas e fosfolipídios (ESTRELA et al., 2002; FUKUZAKI, 2006).

Uma hipótese para a diferença no efeito removedor entre as soluções de gluconato de clorexidina a 4% e de hipoclorito de sódio a 1% e 2% pode ser explicada com base no pH das mesmas. A maioria dos biofilmes naturais forma-se com, ou a partir de pH próximos da neutralidade. Desvios para valores superiores ou inferiores de pH 7, além de apresentar um efeito preponderante no metabolismo microbiano, também afetam diretamente as propriedades superficiais dos microrganismos e das superfícies sólidas, podendo aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as duas entidades e, deste modo, interferir na adesão dos microrganismos às superfícies (BOTT, 1995; CHAVES, 2004). Assim, a solução de hipoclorito de sódio, devido o seu pH alcalino (base forte, $\text{pH} > 11$), pode ter dissolvido as células do biofilme, assim como aumentado a repulsão eletrostática entre as células fúngicas remanescentes e a superfície do material (FUKUZAKI, 2006). Por outro lado, como a clorexidina é comercializada em pH neutro (BONESVOLL et al., 1974), as forças eletrostáticas que mantêm as células aderidas à superfície se mantiveram inalteradas e, deste modo, não afetaram a adesão das células. Além disso, a clorexidina em altas concentrações não dissolve o biofilme, e sim provoca a precipitação do material citoplasmático nas suas células constituintes (LOPES, SIQUEIRA JUNIOR e ELIAS, 1999).

5.2.2 Dos resultados obtidos através de cultura microbiológica

Os resultados obtidos através da análise microbiológica demonstraram a elevada capacidade das soluções desinfetantes testadas de promover a morte das células fúngicas presentes no biofilme, confirmando os achados obtidos pela microscopia confocal.

Na Tabela 6 constata-se que no grupo controle houve crescimento fúngico após o tratamento dos corpos-de-prova com água destilada por 10 minutos. Por outro lado, o total impedimento do crescimento fúngico foi alcançado após a

5 Discussão

desinfecção dos corpos de prova, independente da solução desinfetante testada. Resultados semelhantes a estes só foram alcançados por estudos que utilizaram o hipoclorito de sódio na concentração de 5,25% (RUDD et al., 1984; BELL et al., 1989). No entanto, outras pesquisas (MOORE, SMITH e KENNY, 1984; THERAUD et al., 2004; YILMAZ et al., 2005) que utilizaram soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina, em concentrações próximas ao nosso estudo, demonstraram crescimento, apesar de em baixo número, de *C. albicans* após a desinfecção, quando o método de cultura microbiológica foi utilizado. Divergências encontradas entre os resultados destes estudos podem ser justificadas por diversos fatores, entre eles: diferenças na concentração do inóculo, no tempo de formação do biofilme, no tamanho dos corpos-de-prova, nas condições de incubação e nos meios de cultura para crescimento dos microrganismos usados.

Os resultados obtidos pela cultura microbiológica, somados aos obtidos através do microscópio confocal e do MEV, demonstraram que certos agentes antimicrobianos, como os hipocloritos de sódio a 1% e 2%, combinam o efeito de morte celular e remoção dos biofilmes, enquanto outros, como o gluconato de clorexidina a 4%, apenas promovem a morte celular dos microrganismos. Idealmente, a remoção do biofilme, em adição a uma redução da viabilidade dos microrganismos que o formam, é sempre desejada no controle do biofilme sobre a prótese total, pois um biofilme residual, composto por células mortas, pode ainda atuar como uma fonte de endotoxinas, permitindo a sua rápida recolonização e provendo proteção para novos patógenos (MEILLER et al., 1999; CHEN e STEWART, 2000; LIAQAT e SABRI, 2008). Neste aspecto, as soluções de hipoclorito de sódio a 1% e 2% demonstraram superior efetividade em relação ao gluconato de clorexidina a 4%. Estes achados estão de acordo com o preconizado por Meyer (2003), que afirma que as substâncias cloradas devem ser freqüentemente requeridas como a primeira opção no combate aos biofilmes, devido ao fato de que o cloro, além de promover a morte celular, remove os exopolissacarídeo da superfície, fazendo com que a aderência de novas bactérias seja dificultada.

A partir das observações do corrente estudo, pode ser sugerida para uma futura pesquisa a realização de uma análise mais aprofundada sobre a susceptibilidade *in situ*, através do microscópio confocal, dos biofilmes formados por células fúngicas às soluções desinfetantes. Neste sentido, seria interessante ampliá-

la a um leque mais variado de espécies de fungos e de soluções desinfetantes testadas, uma vez que com o uso generalizado destas substâncias no combate às infecções fúngicas, tem-se observado o surgimento de novas espécies destes microrganismos cada vez mais resistentes a esta terapia.

Porém, estes futuros estudos a esse respeito deveriam ser realizados com biofilmes desenvolvidos em condições padronizadas e mais próximas da realidade. Neste contexto, sugere-se a realização de estudos *in vitro* que utilizem aparelhos, como o CDFF (Constant Depth Film Fermentar) (LAMFON et al., 2005), o qual regula condições de crescimento do biofilme, como a temperatura e o pH, ou a realização de estudos que promovam a formação de biofilmes de modo intra-bucal em dispositivos de acrílico.

Por fim, poderia ser realizada uma análise da efetividade das soluções desinfetantes durante as várias fases de desenvolvimento de um biofilme, o que poderia permitir uma avaliação mais precisa sobre qual, ou quais os possíveis mecanismos de resistência que o biofilme poderia apresentar a estas substâncias.



6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

As soluções de hipoclorito de sódio a 1% e 2% apresentaram um efeito antimicrobiano superior quando comparadas com a solução de gluconato de clorexidina a 4%, pois não só promoveram a morte celular, como também removeram as células de *C. albicans* presentes em biofilmes sobre resina acrílica termopolimerizável. Ademais, ainda provocaram alterações na morfologia das *C. albicans* remanescentes.



*7 Referências
Bibliográficas*

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers. *J Prosthet Dent.* 1981 Apr;45(4):376-9.

Abelson DC. Denture plaque and denture cleansers: review of the literature. *Gerodontology.* 1985 Oct;1(5):202-6.

Alberts B. *Biologia molecular da célula.* 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Allegra F, Gennari PU. *Doenças da mucosa bucal.* 1 ed. São Paulo: Editora Santos; 2000.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979 Nov 20;147(10):267-72.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil.* 1987 May;14(3):217-27.

Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1992 Jul;68(1):191-5.

Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):147-52.

Azeredo J, Lazarova V, Oliveira R. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms : a comparative study. *Water science & technology.* 1999;39(7):243-50.

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Jan;95(1):51-9.

Barnabe W, de Mendonca Neto T, Pimenta FC, Pegoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 2004 May;31(5):453-9.

Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent*. 1998 Apr;79(4):454-8.

Bell JA, Brockmann SL, Feil P, Sackuvich DA. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. *J Prosthet Dent*. 1989 May;61(5):580-3.

Birman EG. *Candida e Candidoses*. In: Tommasi MH, editor. *Diagnóstico em Patologia Bucal*. 3 ed. São Paulo: Pancast; 2002. p. 198-9.

Bobichon H, Bouchet P. Action of chlorhexidine on budding *Candida albicans*: scanning and transmission electron microscopic study. *Mycopathologia*. 1987 Oct;100(1):27-35.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997 Jul;13(4):258-69.

Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol*. 1974 Mar;19(3):209-12.

Bott TR. *Fouling of Heat Exchangers*. New York: Elsevier; 1995.

Brace ML, Plummer KD. Practical denture disinfection. *J Prosthet Dent*. 1993 Dec;70(6):538-40.

Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.

Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc*. 1978 Mar;96(3):474-9.

Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979 Dec;42(6):619-23.

7 Referências Bibliográficas

Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000 Apr;28(2):141-9.

Buergers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2008 Jun;66(3):174-80.

Bunetel L, Bonnaure-Mallet M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy: update on development mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Aug;82(2):161-5.

Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DM. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses*. 2007 Mar;50(2):140-7.

Catalan A, Herrera R, Martinez A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. *J Prosthet Dent*. 1987 May;57(5):581-6.

Cawson RA, Curson I. The effectiveness of some antiseptics on the oral mucous membrane. *Br Dent J*. 1961;111:362-3.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001a Sep;183(18):5385-94.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001b Mar;80(3):903-8.

Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005 Dec;6(8):887-94.

Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995 Sep;74(3):309-13.

Chaves LCD. Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável [Tese]. Braga: Universidade do Minho; 2004.

Chen X, Stewart PS. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Wat. Res.* 2000;34(17):4229-33.

Claus G, Muller R. Biofilms in a paper mill process water system. In: Heitz E, Flemming H, Sand W, editors. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1996. p. 429-37.

Cloete TE, Jacobs L, Brozel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*. 1998;9(1):23-37.

Compagnoni MA, Souza RF, Marra J, Pero AC, Barbosa DB. Relationship between *Candida* and nocturnal denture wear: quantitative study. *J Oral Rehabil.* 2007 Aug;34(8):600-5.

Crockett DN, O'Grady JF, Reade PC. *Candida* species and *Candida albicans* morphotypes in erythematous candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992 May;73(5):559-63.

da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008 Dec;17(8):627-33.

da Silva FC, Rosa LP, Koga Ito CY, Jorge AOC. Desinfecção de placas acrílicas ortodônticas com hipoclorito de sódio e glutaraldeído: estudo in vitro. *Rev odontol UNICID.* 2004;16(1):35-40.

Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J.* 1970 Aug 18;129(4):151-6.

Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J.* 1972 Aug 1;133(3):101-5.

DePaola LG, Minah GE, Elias SA. Evaluation of agents to reduce microbial growth on dental prostheses of myelosuppressed cancer patients. *Clin Prev Dent.* 1984 Mar-Apr;6(2):9-12.

Dills SS, Olshan AM, Goldner S, Brogdon C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. *J Prosthet Dent.* 1988 Oct;60(4):467-70.

7 Referências Bibliográficas

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1387-92.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*. 2002;13(2):113-7.

Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 1986 Jun;112(6):863-9.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001 Jul;27(7):452-5.

Fidel SR, Marques JLL, Antoniazzi JH. Avaliação da capacidade de penetração dentinária radicular da clorexidina associada a três diferentes veículos. *RPG*. 1995;2(3):121-6.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007 Jun;34(6):448-55.

Flotra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *J Periodontal Res Suppl*. 1973;12:41-4.

Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci*. 2006 Dec;11(4):147-57.

Ghalichebaf M, Graser GN, Zander HA. The efficacy of denture-cleansing agents. *J Prosthet Dent*. 1982 Nov;48(5):515-20.

Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol*. 1986 Jun;57(6):370-7.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994 Mar;62(3):915-21.

Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing--the best approach. *Br Dent J*. 1995 Jun 10;178(11):413-7.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2005 Apr;159(3):353-60.

Kitajima EW, Leite B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura [Apostila do 25º curso de microscopia eletrônica de varredura]. Piracicaba: NAP/MEPA; 1997.

Kubinova L, Janacek J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. *Microsc Res Tech*. 2001 Jun 15;53(6):425-35.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):878-88.

Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil*. 2002 Mar;29(3):300-4.

Kulak Y, Arikan A, Albak S, Okar I, Kazazoglu E. Scanning electron microscopic examination of different cleaners: surface contaminant removal from dentures. *J Oral Rehabil*. 1997 Mar;24(3):209-15.

Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994 Sep;72(3):283-8.

Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Dec;5(6):608-11.

Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Jan 15;242(2):345-51.

7 Referências Bibliográficas

Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci.* 2003 Dec;111(6):465-71.

Liaqat I, Sabri AN. Effect of biocides on biofilm bacteria from dental unit water lines. *Curr Microbiol.* 2008 Jun;56(6):619-24.

Lima EM, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2006 May;33(5):356-62.

Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1999 Feb;81(2):202-6.

Lopes HP, Siqueira Junior JF, Elias CN. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HPSJ, José Freitas, editor. *Endodontia: biologia e técnica.* 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. p. 369-96.

MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J Clin Periodontol.* 1997 Oct;24(10):753-60.

Maza JL, Elguezabal N, Prado C, Ellacuria J, Soler I, Ponton J. *Candida albicans* adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Nov;94(5):589-92.

McFeters GA, Yu FP, Pyle BH, Stewart PS. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J Microbiol Methods.* 1995 Jan;21(1):1-13.

McNeme SJ, von Gonten AS, Woolsey GD. Effects of laboratory disinfecting agents on color stability of denture acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1991 Jul;66(1):132-6.

Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA. Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. *J Am Dent Assoc.* 1999 Jan;130(1):65-72.

Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 2003;51:249-53.

Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Haugland RP. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jul;63(7):2897-905.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relined resin. *J Prosthodont.* 2008 Jun;17(4):312-7.

Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent Clin North Am.* 1991 Apr;35(2):323-37.

Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *J Prosthet Dent.* 1984 Aug;52(2):158-63.

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun.* 2003 Aug;71(8):4333-40.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *J Dent.* 1998 May;26(4):299-304.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999 Mar-Apr;12(2):153-9.

Paranhos HF, Panzeri H, Lara EH, Candido RC, Ito IY. Capacity of denture plaque/biofilm removal and antimicrobial action of a new denture paste. *Braz Dent J.* 2000;11(2):97-104.

Paulus W. *Microbicides for the Protection of Materials – A Handbook.* London: Chapman & Hall 1993.

Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003 May;30(5):532-6.

Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont.* 2007 May-Jun;20(3):308-10.

7 Referências Bibliográficas

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008 Aug;53(8):755-64.

Phillips FA. *Materiais dentários de Skinner*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1986.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995 Jan;22(1):1-14.

Rahal JS, Mesquita MF, Henriques GE, Nobilo MA. Surface roughness of acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. *J Oral Rehabil*. 2004 Nov;31(11):1075-9.

Rudd RW, Senia ES, McCleskey FK, Adams ED, Jr. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. *J Prosthet Dent*. 1984 Mar;51(3):318-21.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol*. 1980;25(8-9):611-5.

Sartori EA, Schmidt CB, Walber LF, Shinkai RS. Effect of microwave disinfection on denture base adaptation and resin surface roughness. *Braz Dent J*. 2006;17(3):195-200.

Sesma N, Takada KS, Laganá DC, Jaegger RG, Azumbuja Júnior N. Eficiência de Métodos Caseiros de Higienização e Limpeza de Próteses Parciais Removíveis. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1999;53(6):463-8.

Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2006 May-Jun;19(3):288-93.

Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2008 Aug;57(Pt 8):966-73.

Stewart PS, Griebe T, Srinivasan R, Chen CI, Yu FP, deBeer D, et al. Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 1994 May;60(5):1690-2.

Theilade J, Budtz-Jorgensen E. Electron microscopic study of denture plaque. *J Biol Buccale.* 1980 Dec;8(4):287-97.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007 Aug;52(8):761-7.

Theraud M, Bedouin Y, Guiguen C, Gangneux JP. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbiol.* 2004 Oct;53(Pt 10):1013-8.

Van Reenen JF. Microbiologic studies on denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1973 Oct;30(4):493-505.

Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992 Aug;37(8):613-22.

Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997 May;77(5):535-9.

Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998a Jun;25(6):416-23.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998b Feb;43(1):45-50.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J.* 1998c Aug;43(4):244-9.

Webb BC, Willcox MD, Thomas CJ, Harty DW, Knox KW. The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. *Oral Microbiol Immunol.* 1995 Dec;10(6):334-41.

7 Referências Bibliográficas

Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Lost C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J*. 2002 Feb;35(2):166-71.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997 Apr;23(4):229-31.

Williams DW, Potts AJ, Wilson MJ, Matthews JB, Lewis MA. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 1997 Feb;26(2):83-9.

Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res*. 2000 Jan;79(1):21-7.

Yilmaz H, Aydin C, Bal BT, Ozcelik B. Effects of disinfectants on resilient denture-lining materials contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, and *Candida albicans*. *Quintessence Int*. 2005 May;36(5):373-81.

Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res*. 2001 May;80(5):1436-40.



Apêndices

Apêndices

APÊNDICE A – NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Campo 6	Total
Controle 1	512	833	639	603	521	692	3800
Controle 2	1453	915	1391	1181	1008	3248	9196
Controle 3	1439	1963	2779	2834	2619	2088	13722
Controle 4	396	671	1316	359	296	659	3697
Controle 5	549	386	1182	1846	1173	351	5487
Controle 6	533	1103	820	782	919	754	4911
Clorexidina 1	0	0	0	0	0	0	0
Clorexidina 2	0	0	0	0	0	0	0
Clorexidina 3	0	0	0	0	0	0	0
Clorexidina 4	0	0	0	0	0	0	0
Clorexidina 5	0	0	0	0	0	0	0
Clorexidina 6	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 1	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 2	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 3	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 4	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 5	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 6	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 1	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 2	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 3	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 4	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 5	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 6	0	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE B – NÚMERO DE CÉLULAS NÃO VIÁVEIS

	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Campo 6	Total
Controle 1	12	6	0	5	9	19	51
Controle 2	5	2	4	13	15	1	40
Controle 3	2	0	2	0	2	1	7
Controle 4	4	9	18	4	0	3	38
Controle 5	4	42	39	48	126	402	661
Controle 6	1	4	0	2	2	1	10
Clorexidina 1	521	461	529	561	1093	233	3398
Clorexidina 2	1561	1329	1556	1258	923	1315	7942
Clorexidina 3	229	81	119	322	220	122	1093
Clorexidina 4	1342	1389	1403	1724	1663	1911	9432
Clorexidina 5	1247	2011	1944	2175	2255	2329	11961
Clorexidina 6	1052	784	1291	1586	2048	1218	7979
Hipoc 1% 1	0	0	41	22	0	0	63
Hipoc 1% 2	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 3	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 1% 4	0	3	27	0	3	3	36
Hipoc 1% 5	2	3	0	1	0	10	16
Hipoc 1% 6	27	6	8	4	1	14	60
Hipoc 2% 1	1	2	0	4	16	6	29
Hipoc 2% 2	6	0	3	0	18	0	27
Hipoc 2% 3	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 4	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 5	0	0	0	0	0	0	0
Hipoc 2% 6	4	7	5	4	0	0	20

*Apêndices***APÊNDICE C – NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS**

Controle 1	3851
Controle 2	9236
Controle 3	13729
Controle 4	3735
Controle 5	6148
Controle 6	4921
Clorexidina 1	3398
Clorexidina 2	7942
Clorexidina 3	1093
Clorexidina 4	9432
Clorexidina 5	11961
Clorexidina 6	7979
Hipoc 1% 1	63
Hipoc 1% 2	0
Hipoc 1% 3	0
Hipoc 1% 4	36
Hipoc 1% 5	16
Hipoc 1% 6	60
Hipoc 2% 1	39
Hipoc 2% 2	31
Hipoc 2% 3	0
Hipoc 2% 4	0
Hipoc 2% 5	0
Hipoc 2% 6	0

APÊNDICE D – NÚMERO DE UFC/mL

Controle 1	8,4.10 ³
Controle 2	11,6. 10 ³
Controle 3	10. 10 ³
Controle 4	13,6. 10 ³
Controle 5	16,4. 10 ³
Controle 6	12,4. 10 ³
Clorexidina 1	0
Clorexidina 2	0
Clorexidina 3	0
Clorexidina 4	0
Clorexidina 5	0
Clorexidina 6	0
Hipoc 1% 1	0
Hipoc 1% 2	0
Hipoc 1% 3	0
Hipoc 1% 4	0
Hipoc 1% 5	0
Hipoc 1% 6	0
Hipoc 2% 1	0
Hipoc 2% 2	0
Hipoc 2% 3	0
Hipoc 2% 4	0
Hipoc 2% 5	0
Hipoc 2% 6	0

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)