

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MURILO FERNANDES HOSCHARUK

EFEITO ANTIFÚNGICO DE DIFERENTES AGENTES QUÍMICOS DE DESINFECÇÃO
EM RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE

Porto Alegre

2011

MURILO FERNANDES HOSCHARUK

EFEITO ANTIFÚNGICO DE DIFERENTES AGENTES QUÍMICOS DE DESINFECÇÃO
EM RESINA ACRÍLICA PARA BASE DE PRÓTESE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção
do título de Cirurgião-Dentista

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lina Naomi Hashizume

Porto Alegre

2011

Hoscharuk, Murilo.

Efeito antifúngico de diferentes agentes químicos de desinfecção em resina acrílica para base de prótese / Murilo Hoscharuk. – 2011.

24 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientador: Lina Naomi Hashizume

1. Desinfecção. 2. *Candida albicans*. 3. Resina acrílica. I. Hashizume, Lina Naomi.

II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Lina Naomi Hashizume, por seriedade, competência e dedicação, além da cuidadosa orientação na realização desse trabalho. Agradeço pela confiança depositada em mim no início do projeto. Muito Obrigado!

À Prof^ª Carmen Beatriz Borges Fortes, pela orientação na escolha do assunto, ajuda e auxílio na confecção dos corpos de prova.

Ao Laboratório de Materiais Dentários da FO-UFRGS (LAMAD), pela disponibilização de equipamentos para a realização do trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da FO-UFRGS (LABIM), pela disponibilização de materiais e equipamentos para a realização do trabalho.

Ao colega e amigo Ruggiero Stello, pela amizade, companhia e risadas.

A todos os meus amigos pelo apoio, incentivo e carinho que me deram.

RESUMO

HOSCHARUK, Murilo Fernandes. **Efeito antifúngico de diferentes agentes químicos de desinfecção em resina acrílica para base de prótese**. 2011. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

O presente estudo avaliou a eficácia antimicrobiana sobre *Candida albicans* de quatro agentes químicos no processo de desinfecção de resina acrílica para base de prótese dental. Sessenta corpos de prova (CP) foram confeccionados em resina acrílica. Eles foram divididos em 4 grupos testes (hipoclorito de sódio 1%; digluconato de clorexidina 2%; vinagre (ácido acético 4%); peróxido de hidrogênio 10v e 2 grupos controle (positivo e negativo). Todos os grupos foram submetidos ao mesmo tempo de imersão (10 min.). Os CP foram contaminados com uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 18804) exceto os do controle negativo. Após a desinfecção com os agentes químicos ou controles, os CP foram imersos em 5 mL do meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) e incubados por 24 horas a 37°C. O crescimento de *Candida albicans* foi avaliado através da leitura dos meios de cultura no espectrofotômetro a 530 nm. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente usando teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$. Digluconato de clorexidina 2%, e hipoclorito de sódio 1% apresentaram desempenho de inibição máxima. Vinagre e peróxido de hidrogênio 10V mostraram capacidade de diminuição de *Candida albicans* nos meios de cultura BHI, no entanto, peróxido de hidrogênio apresentou os piores resultados entre as soluções desinfectantes testadas. Esse estudo *in vitro* sugere que digluconato de clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 1% e vinagre (ácido acético 4%) podem ser indicadas pelo cirurgião-dentista aos seus pacientes para uma melhor limpeza e higienização de próteses a base de resina acrílica polimerizadas por microondas, levando em consideração: os efeitos adversos de cada solução e o perfil sócio-econômico do paciente.

Palavras-chave: Desinfecção. *Candida albicans*. Resina acrílica.

ABSTRACT

HOSCHARUK, Murilo Fernandes. **Antifungal effect of different disinfection chemical agentes in acrylic resins for denture bases.** 2011. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

This study evaluated the antimicrobial efficacy against *Candida albicans* in four chemical disinfection process for acrylic resin-based dental prostheses. Sixty specimens (CP) were made of acrylic resin. They were divided into four test groups (1% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine digluconate, vinegar (acetic acid 4%), hydrogen peroxide 10v and 2 control groups (positive and negative). All groups were submitted to the same immersion time (10 min.). The CP were contaminated with a suspension of *Candida albicans* (ATCC 18804) except the negative control. After disinfection with chemical agents or controls, the CP were immersed in 5 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI) and incubated for 24 h at 37 ° C. The growth of *Candida albicans* was evaluated by reading the culture media in a spectrophotometer OD 530 nm transmittance. The results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Turkey test, with significance level of $p < 0.05$. 2% chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite 1% had a performance of maximum inhibition. Vinegar and hydrogen peroxide 10V showed decreased ability of *Candida albicans* in culture media BHI, however, hydrogen peroxide showed the worst results among the tested disinfectant solutions. This *in vitro* study suggests that chlorhexidine digluconate 2%, 1% sodium hypochlorite and vinegar (acetic acid 4%) may be indicated by the dentist to his patients for better cleaning and sanitation of the microwave-polymerized acrylic resin prosthesis, taking into account: the adverse effects of each solution and the socio-economic profile of the patient.

Key words: Disinfection. *Candida albicans*. Acrylic resins.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – Brain Heart Infusion

CP – Corpo de prova

cm – centímetro

g – grama

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IL – Illinois

ISO – International Organization for Standardization

Kg – quilograma

min. – minuto

MMA – Metacrilato de metila

n°. – número

nm – nanometros

OD - Optical Density

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro.

T – Transmitância

UK – United Kingdom

USA – United States of America

V – Volumes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	CONFECCÃO DOS CORPOS DE PROVA	13
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	14
3.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	14
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4	RESULTADOS	16
5	DISCUSSÃO	17
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
	REFERÊNCIAS	21
	ANEXO – Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Pesquisa de Odontologia, FO-UFRGS	24

1 INTRODUÇÃO

As resinas acrílicas (polimetacrilato de metila) são materiais amplamente utilizados na odontologia e assim devem apresentar: estabilidade dimensional e de cor, ausência de sabor e de cheiro, e isentas de toxicidade e de irritabilidade aos tecidos, pois são utilizadas na cavidade oral, onde são submetidas a todas as variações que esse ambiente proporciona. O polimetacrilato de metila é comumente utilizado em bases de próteses totais (AZZARI, 2003).

As resinas acrílicas são homopolímeros, conceito aplicado quando o polímero apresenta um único tipo de monômero. As resinas acrílicas têm sua reação de polimerização desencadeada por um agente ativador, que fornece energia química, térmica ou de microondas para um agente iniciador (FORTES, 2007). O agente iniciador absorve esta energia e forma radicais livres e estes são o centro ativo que servem para unir as moléculas de monômero formando uma reação em cadeia onde há o crescimento molecular até que, pela adição de um agente de terminação, esse processo é interrompido (MANO, 1999).

Conforme o agente de ativação (químico, térmico ou físico), as resinas acrílicas são classificadas pela International Organization for Standardization (ISO) 1567, em 2009, como: tipo 1 (polímeros termo-polimerizáveis), tipo 2 (polímeros auto polimerizáveis), tipo 3 (polímeros termoplásticos), tipo 4 (polímeros foto ativados) e tipo 5 (polímeros ativados por energia de microondas). A polimerização por energia de microondas, por sua vez, foi primeiramente relatada por Nishii, em 1968, e representa um método alternativo de polimerização. Essa técnica é mais rápida e limpa e apresenta as mesmas propriedades físico-mecânicas da técnica de polimerização por imersão em água (tipo 1). Ainda tem como vantagem uma precisão de ajuste, o que resulta em uma melhor adaptação da base da prótese (YANNIKAKIS et al., 2002).

Nas resinas acrílicas do tipo 5, a polimerização por energia de microondas (ondas eletromagnéticas, não ionizantes) é iniciada quando as moléculas de MMA – que são polares – orientam-se sob a ação do campo elétrico gerado pelas microondas, entrando em ressonância e vibrando na mesma frequência desse campo. Essa é uma das formas em que ocorre a transformação da energia eletromagnética em calor, o que se chama de condução iônica. Assim, o material se aquece em função das inúmeras colisões intermoleculares que ocorrem nesse processo e, conforme esse calor gerado se propaga, ocorre decomposição do peróxido de benzoila, formando radicais livres. Através desses radicais livres, as moléculas unem-se, estabelecendo ligações covalentes. Isso caracteriza a reação de polimerização e

forma um polímero de elevado peso molecular. A maior vantagem desse processo é a diminuição do tempo de polimerização (AZZARI, 2003).

Toda superfície na cavidade oral, natural ou sintética, torna-se coberta, dentro de aproximadamente 30 minutos, por um precipitado de 0,5 a 1,5 μm de glicoproteínas e de imunoglobulinas, denominada “película” (SKJORLAND et al., 1995). Essa película serve de arcabouço para que restos orais (tais como a mucina, partículas de alimento e células epiteliais descamadas) e micro-organismos (bactérias e fungos) possam prontamente aderir. Microporosidades na superfície da prótese em acrílico favorecem o acúmulo de micro-organismos que podem prejudicar a saúde de um paciente fisicamente debilitado (SHAY, 2000). É comumente aceito que espécies de Cândia, em particular a *Candida albicans*, estão entre muitos dos agentes causadores de estomatites por próteses. Portanto, a higiene das próteses e a remoção da placa são procedimentos extremamente importantes na manutenção da saúde oral (WEBB et al., 2005). Apenas a escovação muitas vezes é insuficiente no controle de placas em próteses (DILLS et al., 1988), e assim, para se conseguir melhor higienização, métodos químicos devem ser associados (KULAK-OZLAN et al., 2002).

A limpeza da prótese dentária é indispensável para a saúde geral da população edêntula. Entretanto, a limpeza pode se tornar um desafio para pacientes idosos que não podem realizar uma adequada escovação por causa de doenças, como por exemplo: demência e baixa habilidade manual. O resultado de uma má higiene das próteses ocasiona a proliferação de micro-organismos causadores de doenças como a estomatite. Esta doença é caracterizada por uma candidíase (infecção fúngica) que surge como resultado de uma higiene deficiente da prótese e do uso desta durante 24 horas do dia (WILLIAMS, 2001). Sob essas condições, a área estagnada acima da superfície interna da dentadura fornece um ambiente ideal para o crescimento de Cândia, que é perito em aderir ao acrílico utilizado como material base para a prótese (CANNON, 1999).

Nikawa et al. (2003) afirmam que a formação do biofilme na prótese dentária e sua colonização pela *Candida albicans* é de muita importância para o desenvolvimento da candidíase. O uso rotineiro de desinfetantes de próteses totais removíveis é um eficiente método para controle da placa em suas superfícies. Entretanto, os autores alertam para a incompatibilidade dos desinfetantes das próteses, porque estes causam danos a elas, aumentando sua porosidade, agravando, assim, o problema da colonização pela *Candida albicans*.

A alta incidência de estomatite decorrente do uso de próteses totais removíveis levou Jorge (1991) a realizar um estudo, na cidade de Piracicaba (SP), onde examinou 270 idosos

institucionalizados, para avaliar o estado de saúde da mucosa oral. A maior parte das lesões encontradas era proveniente do uso das próteses. Dentre essas, a mais comum foi a estomatite protética, seguida da hiperplasia fibrosa e queilite angular.

Uludamar et al. (2010), realizou um estudo *in vivo* com usuários de prótese total e com evidências de estomatite protética. Ao tentar eliminar a existência de *Candida albicans* nas dentaduras utilizando diferentes marcas de comprimidos de peróxido alcalino, não obteve diferença estatística relevante para duas marcas, e a seguinte mostrou uma alta redução apenas depois de 60 minutos de tratamento. Paranhos et al. (2008) buscou em seu estudo avaliar a eficácia de métodos mecânico, químico e a combinação de ambos contra diferentes biofilmes microbiológicos. Em seus resultados, observou que a técnica combinada, foi mais efetiva do que o método químico, na maioria das espécies testadas.

Chassot et al. (2006), concluiu que a imersão em ácido peracético por pelo menos cinco minutos foi eficaz na desinfecção de resinas acrílicas termicamente ativada, quimicamente ativada e polimerizada em forno de microondas contaminadas tanto com saliva humana, quanto com *Bacillus subtilis* ou *Bacillus stearothermophilus*. Entretanto, essa substância possui maior utilização para evitar contaminação cruzada em laboratórios e consultórios dentários, do que propriamente utilização para o cotidiano.

Outro estudo de contaminação cruzada apresenta entre seus resultados a inibição de crescimento microbiológico após a imersão por 10 minutos das próteses em resina acrílica na solução de hipoclorito de sódio 1% (PAVARINA et al. 2003).

Para proporcionar a desinfecção de próteses, diversos produtos podem ser utilizados, como Hipoclorito de sódio, Digluconato de clorexidina, Ácido acético, e Peróxido de hidrogênio, entretanto, não há consenso do melhor agente desinfetante, quando relacionado o poder desinfetante com alterações físicas da estrutura do acrílico. Além disso, é importante que o desinfetante seja acessível à maioria da população para que ele seja utilizado.

O mecanismo de atuação do peróxido de oxigênio é explicado pela liberação de bolhas de oxigênio que mecanicamente eliminam os detritos presentes na superfície da prótese dentária. Peróxidos também são recomendados para a remoção de mucina presente na saliva e restos de alimentos e pode também prevenir a formação de manchas e cálculo (ANTONY, 1958). Eles também podem ser usados como agente antimicrobianos, no entanto, possuem o efeito adverso de clareamento de materiais plásticos (MONTAGNER et al., 2009).

O hipoclorito de sódio é uma substância de baixo custo, apresenta uma atividade de amplo espectro e requer um curto período de desinfecção. Apesar de suas eficiências como desinfetante, o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens, como atividade

corrosiva em superfícies metálicas, efeito irritante a pele e outras células e destruição de tecidos, inclusive cotton (BELL, 1989).

A eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio baseia-se em seu pH elevado (ação dos íons hidroxila) parece similar ao mecanismo de ação do hidróxido de cálcio. O pH elevado de hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática com inibição enzimática irreversível, alterações de biossíntese no metabolismo celular e destruição de fosfolípidios observado em peroxidação lipídica. A oxidação promove inibição enzimática irreversível de bactérias substituindo o hidrogênio com o cloro. A inativação enzimática pode ser observada na reação do cloro com grupos amino (NH₂-) e uma oxidação irreversível dos grupos sulfidril (SH) de bactérias enzimas (cisteína). Assim, o hipoclorito de sódio apresenta atividade antimicrobiana, com ação sobre sítios essenciais enzimáticos das bactérias promovendo a inativação enzimática irreversível, originando porções hidroxila e ação cloraminação. A dissolução de tecido orgânico pode ser verificada na reação de saponificação, quando hipoclorito de sódio destrói ácidos graxo se lipídeos resultando em sabão e glicerol (ESTRELA et al. 2003).

Chau (1995) observou que além da desinfecção da superfície de resina acrílica, o hipoclorito de sódio a 1% foi também efetivo na eliminação de micro-organismos da superfície interna do material, após dez minutos.

Montagner et al. (2009) sugere 0,5% hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogênio 10V como agentes para desinfecção de dentaduras porque são acessíveis e mostram ação antifúngica adequada.

Sousa et al. (2009) estudou a atuação de substâncias químicas na aderência de *Candida albicans* em resinas termicamente ativadas. Entre as substâncias digluconato de clorexidina 0,12%, vinagre, bicarbonato de sódio 5% e CoregaTabs®, apenas os agentes clorexidina e bicarbonato de sódio apresentaram diferença estatística significativa na redução da *Candida albicans*.

A clorexidina é uma substância química que foi introduzida há muitos anos como anti-séptico de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas (DAVIES et al., 1954). É uma bisbiguanida com propriedades catiônicas. Quimicamente, é classificada como Digluconato de Clorexidina, é uma molécula estável que, quando ingerida, é excretada pelas vias normais, sendo que a pequena porcentagem retida no organismo não é tóxica. Quando em baixas concentrações, provoca lixiviação de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e bactericida em altas concentrações (SILVA et al., 2002). Age nas bactérias rompendo a integridade de suas membranas

citoplasmáticas resultando na perda de constituintes celulares vitais como o ácido nucleico e potássio (JORGE, 1997).

Em odontologia, a solução de clorexidina surgiu como desinfetante de campo cirúrgico e de canais radiculares (CAWSON; CURSON, 1959). Atualmente, suas aplicações aumentaram, sendo eficaz na higienização de próteses (SESMA et al., 1999), degermação das mãos (SILVA et al., 2000; MAGROFILHO et al., 2000), redução do número de *Streptococcus mutans* na cavidade bucal e, conseqüentemente, na redução do risco de cárie e doença periodontal (DENARDI, 1994; RIBEIRO, 2000).

Mina et al. (2011), avaliou diferentes concentrações de solução de clorexidina (0,12%, 1% e 2%) em próteses de resina colonizadas com cepas de *Candida albicans* resistentes a AZOLE®. Clorexidina 2% foi a concentração mais efetiva para desinfecção das próteses.

O uso do vinagre como desinfetante não é freqüentemente discutido em Odontologia, entretanto, é uma substância bastante acessível e tem sido utilizada popularmente para desinfecção de próteses dentárias (LOPES et al., 2009). Na literatura de outras áreas, é citado como uma alternativa promissora de desinfetante, principalmente devido à sua baixa toxicidade. No estudo de Silva et al. (2009), o vinagre foi tão eficaz como as mais freqüentemente empregadas substâncias desinfetantes (hipoclorito de 1% e glutaraldeído 2%) contra *Candida albicans*. Além disso, sugere que a digluconato de clorexidina possui não só maior atividade desinfetante contra bactérias gram-positivas, como também alta eficácia contra a *Candida albicans*. Já no estudo de Pinto (2008), que avaliou o vinagre como agente de controle antimicrobiano contra *Candida albicans* em pacientes usuários de dentaduras totais superiores, por 45 dias, apresentou em seus resultados significativa redução na contagem de *Candida albicans* em UFC/mL após o tratamento com a solução.

Além disso, Basson et al. (1992), afirma que o vinagre (solução de ácido acético) apresentou eficácia na destruição da aderência dos microrganismos em seu estudo, embora menos eficaz que os alvejantes caseiros.

A descoberta da substância desinfetante que seja acessível do ponto de vista financeiro e que seja eficaz contra *Candida albicans* é de extrema importância. Pois uma correta indicação de limpeza das próteses dentárias e uso por parte do paciente acarretará na redução de alterações na mucosa da população edêntula.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia antifúngica de alguns agentes de desinfecção com custo acessível à população em resina acrílica para base de prótese dental contra *Candida albicans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia antifúngica do hipoclorito de sódio 1%, digluconato de cloroquina 2 %, vinagre (ácido acético 4%) e peróxido de hidrogênio 10V sobre *Candida albicans* aderida em superfície de resina acrílica para base de prótese dental.
- Comparar os resultados de todos os agentes testados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS (Anexo).

3.1 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Foram confeccionados 60 corpos de prova (CP) com resina acrílica polimerizada com energia de microondas (tipo 5) da marca comercial Onda Ceryl (Artigos Odontológicos Clássico LTDA, São Paulo, Brasil) na cor rosa média com fibras de nylon.

Os CP foram obtidos a partir de uma matriz feita com silicona de adição medindo 2,5 cm x 2,5 cm e com uma espessura de 0,3 cm. Em cada mufla de fibrocerâmica, específica para microondas, foram incluídas quatro matrizes de silicona.

A inclusão destas na mufla foi feita com o gesso comum tipo II. O gesso foi manipulado manualmente na proporção água/pó de 0,50 (50 mL de água para 100 g de gesso). Após o tempo de presa do gesso (60 min.), a mufla foi aberta e as matrizes de silicona foram removidas com uma sonda exploradora nº. 5. Estas matrizes de silicona deixaram um espaço dentro do gesso onde foi preenchido com a resina acrílica.

O preparo da resina foi feito de acordo com as recomendações do fabricante. A proporção polímero/monômero utilizada foi de 10g/5g (2/1 em massa). A resina, na fase de massa, foi acomodada nos espaços deixados pelas matrizes de silicona no gesso. Colocou-se uma folha de papel celofane transparente (molhado em água) sobre a resina e a seguir a mufla foi fechada para receber a prensagem preliminar com uma carga de 500 kg. Imediatamente, a mufla foi aberta para a retirada do papel celofane e a remoção dos excessos de resina.

Cada mufla foi fechada e parafusada sendo, então, levada para a prensagem definitiva com uma carga de 1000 kg. Após 30 minutos da prensagem, a mufla foi colocada no forno de microondas para a polimerização da resina. O ciclo de polimerização foi de 20 minutos à 100 Watts de potência e 5 minutos à 400 Watts (FORTES, 2007). Após o resfriamento da mufla (4 horas) esta foi aberta e os cp de resina acrílica foram removidos do gesso.

Os corpos de prova sofreram processo de acabamento com fresas de tungstênio para remoção de irregularidades em seus rebordos. Entretanto, não receberam polimento nas demais faces para procurar mimetizar ao máximo a superfície irregular e rugosa da parte interna da prótese dentária que fica em contato com a mucosa oral do paciente.

Os CP foram lavados um a um durante 30 segundos em água corrente e a seguir foram secados individualmente com papel absorvente até o completo desaparecimento da umidade da sua superfície.

Os corpos de prova foram imersos em água destilada a fim de promover o máximo de sorção de água para prevenir, quando em cultura, a ocorrência de distorção e liberação de monômero residual depois da polimerização (BRAUN et al., 2003).

A fim de evitar o crescimento de outros micro-organismos durante a realização da pesquisa, os corpos de prova foram submetidos previamente a um processo de esterilização em plasma de peróxido de hidrogênio no HCPA.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os CP foram divididos aleatoriamente e colocados em seis grupos com 10 amostras cada um.

1. Grupo A: imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos;
2. Grupo B: imersão em solução de digluconato de clorexidina 2,0 %, durante 10 minutos;
3. Grupo C: imersão em solução de vinagre (ácido acético 4%), durante 10 minutos;
4. Grupo D: imersão em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes, por 10 minutos;
5. Grupo E: imersão em solução salina estéril, por 10 minutos, sem contaminação (controle negativo);
6. Grupo F: imersão em solução salina estéril por 10 minutos, com contaminação (controle positivo).

3.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A eficácia do processo de desinfecção foi avaliada por meio de ensaios microbiológicos que consistiram em verificar o crescimento do fungo *Candida albicans* no meio de cultura e na superfície do corpo de prova. Culturas puras de *Candida albicans* (ATCC 18804) foram crescidas em placas de Agar Sabouraud (Oxoid, Basingstoke, UK) a 25°C. Após 24 horas, as colônias foram suspensas em tubos contendo 5 mL de Brain Heart Infusion (Oxoid, Basingstoke, UK). A suspensão de células em cada tubo foi ajustada através de espectrofotômetro a 800 nm (O.D. 800) e transmitância de 90 T (equivalente a 0,5 na escala de MacFarland = $1,5 \times 10^8$ UFC).

Os corpos de prova foram incubados nos tubos contendo as suspensões em estufa a 37° C, durante 24 horas, para promover o crescimento do fungo e a contaminação dos corpos de prova. Exceto os CP do grupo E (controle negativo). Foram ao todo 4 grupos teste

(hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, vinagre - ácido acético 4% e peróxido de hidrogênio 10V) e 2 grupos controle (positivo e negativo).

Os corpos de prova utilizados como controle positivo do ensaio microbiológico foram retirados do meio de cultura contendo o fungo, lavados por 5 minutos em solução salina estéril, e logo após colocados em outros frascos contendo BHI. Estes corpos de prova não foram submetidos à desinfecção. Os demais corpos de prova, previamente contaminados (exceto os do controle negativo), foram lavados por 5 minutos em solução salina estéril e a seguir submetidos aos métodos de desinfecção. Após a desinfecção, os CP foram colocados em outros tubos de ensaio contendo um novo meio de cultura BHI. Estes meios de cultura contendo os corpos de prova foram incubados a 37°C, durante 24 horas. Após este período de incubação, o crescimento do micro-organismo foi avaliado através da observação da turvação do meio de cultura e do aspecto do corpo de prova, além da leitura dos meios de cultura no espectrofotômetro, transmitância OD 530 nm.

A checagem para confirmar o crescimento de apenas *Candida albicans* nas amostras foi realizada através do plaqueamento dos meios contaminados em Agar Sabouraud com cloranfenicol.

A metodologia utilizada nesse estudo foi adaptada a partir dos estudos de Montagner et al. 2009.

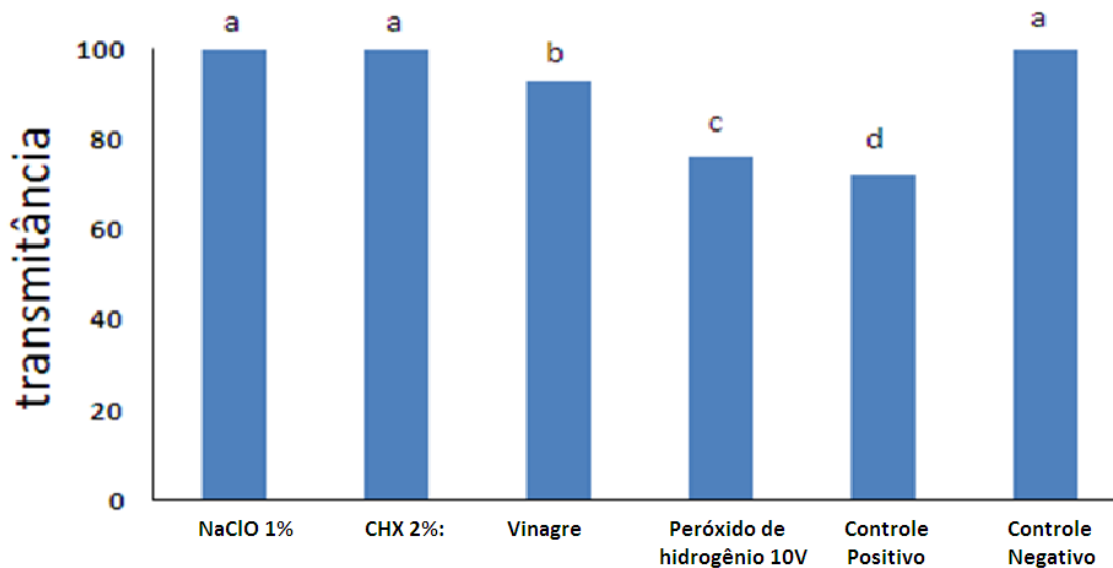
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente usando o Software SPSS 10.0 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) usando teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados do estudo estão apresentados na figura abaixo.

Figura - Medianas dos valores de transmitância para os agentes químicos testados e os controles (n=10). NaClO 1% : hipoclorito de sódio 1%; CHX 2%: digluconato de clorexidina 2%. Letras diferentes significam diferença significativa (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: autor.

Todas as substâncias estudadas nessa pesquisa mostraram uma redução de *Candida albicans* nos meios de cultura. Hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2% e controle negativo apresentaram os maiores valores de transmitância. Entre os grupos tratados com hipoclorito de sódio 1% e digluconato de clorexidina 2% não foi observado diferença ($p > 0,05$). E ambos os grupos foram iguais ao controle negativo que não havia sido contaminado. Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos vinagre, peróxido de hidrogênio e o controle positivo, entre si e em relação aos grupos hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2% e controle negativo ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou-se a eficácia do hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, vinagre (ácido acético 4%) e peróxido de hidrogênio 10V sobre *Candida albicans* aderida em superfície de resina acrílica para base de prótese dental.

Em ordem decrescente de eficácia antifúngica foram encontrados digluconato de clorexidina 2% = hipoclorito de sódio 1%, vinagre (ácido acético 4%) e peróxido de hidrogênio 10V.

Dentre as soluções desinfetantes testadas o digluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 1% demonstraram melhor desempenho contra *Candida albicans* aderida em superfície de resina acrílica. Foram iguais estatisticamente com o grupo controle negativo que não havia sido contaminado.

Nossos resultados em relação ao digluconato de clorexidina a 2% concordam com o trabalho de Silva et al. (2007), que avaliou a efetividade *in vitro* de digluconato de clorexidina 2% e demais substâncias contra: *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Em outro estudo, Sousa et al. (2009) utiliza digluconato de clorexidina, embora em menor concentração (0,12%), e relata em seus resultados diferença significativa na redução de UFC/mL de *Candia albicans*.

Ao estudar diferentes concentrações de clorexidina, Mina et al. (2011), demonstrou em sua pesquisa que após dez minutos de imersão em clorexidina 2% fora a concentração mais eficaz contra *Candida albicans* resistente a fluconazol, resultado semelhante aos encontrados em nosso estudo. Entretanto, Montagner et al. (2009) apresentaram resultados que indicam digluconato de clorexidina 2% como não sendo efetiva contra *Candida albicans*. Entre seus argumentos está a variedade de concentrações e períodos de imersão utilizados em outros estudos. A diferença nos resultados obtidos entre Montagner et al. (2009) e no presente estudo, pode ser explicada pela utilização de um neutralizador para clorexidina (Tween 80 e 0,07% lecitina) utilizada no estudo dos autores citados. Este neutralizador possivelmente interferiria numa das principais vantagens da clorexidina em relação às das outras soluções, que é a sua substantividade. O presente estudo não utilizou nenhum tipo de neutralizador para simular ao máximo a utilização clínica da solução, ou seja, a solução em condições normais em contato com a prótese dentária do indivíduo.

Em relação ao efeito do hipoclorito de sódio 1%, com inibição semelhante ao do digluconato de clorexidina a 2%, os resultados do presente estudo concordam com vários estudos encontrados na literatura.

Segundo Silva et. al (2008), o hipoclorito de sódio 1% apresentou a melhor efetividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, entre eles *Candida albicans*. Pavarina et al. (2003), também constataram que a utilização de hipoclorito 1%, durante 10 minutos, é efetivo contra micro-organismos inclusive bactérias do tipo esporos.

O estudo de Montagner et al. (2009), também aponta a solução de hipoclorito de sódio (0,5%) como agente desinfetante mais eficiente contra *Candida albicans*. Assim como Estrela et al. (2003) que demonstrou efetividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, em maior concentração, 2% contra uma série de microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*.

Apesar do vinagre (ácido acético 4%) ter apresentado um resultado menor que dos obtidos para digluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 1%, o mesmo demonstrou um efeito antifúngico elevado contra *Candida albicans*. Existem poucos estudos a respeito da utilização do vinagre como solução capaz de possuir uma capacidade antifúngica e, conseqüentemente, seu uso como um meio alternativo de desinfecção para próteses dentárias.

Silva et al. (2008) também indica o vinagre como alternativa válida para a desinfecção de resina acrílica a partir dos resultados apresentados em seu estudo. Entretanto, Sousa et al. (2009), demonstrou resultados negativos em relação ao uso do vinagre, relatando que sua utilização seria ineficiente na redução do número de colônias de *Candida albicans* existentes nos espécimes pesquisados. Pinto et al. (2008) realizaram um estudo onde os pacientes desinfetavam suas próteses totais removíveis em vinagre 10% (diluído em água destilada), durante toda a noite por 45 dias. A solução não eliminou a *Candida albicans*, mas reduziu o número de UFC/mL na saliva e a presença de estomatite nos pacientes. A utilização do vinagre em uma menor concentração pode ser um dos fatores que contribuíram para a não eliminação do fungo no estudo de Pinto et al. (2008).

Outro desinfetante testado no presente estudo foi o peróxido de hidrogênio 10V. O peróxido de hidrogênio 10V apresentou o menor efeito antifúngico contra *Candida albicans*. Estes resultados discordam dos encontrados por Montagner et al. (2009) que observaram elevada eficácia deste agente. Uma possível explicação para essa diferença seria o tempo de imersão de 30 minutos, maior que o utilizado no presente estudo. A proposta do presente estudo foi de utilizar o mesmo tempo para todas as soluções testadas, no intuito de avaliar a eficácia do agente desinfetante e não a variável tempo na ação antifúngica contra *Candida albicans* em resina acrílica. A utilização do tempo de imersão de 10 minutos estabelecido para todos os desinfetantes testados nesta pesquisa simularia um período de tempo em que o

usuário de próteses utilizaria para realizar a desinfecção de suas próteses, durante a sua higiene diária.

A escolha dos desinfetantes testados neste estudo foi baseada na acessibilidade de compra pelos pacientes e efeito antifúngico contra *Candida albicans*. A união destes dois fatores (acessibilidade e efetividade antifúngica) foi encontrada para os desinfetantes hipoclorito de sódio a 1% e o vinagre (ácido acético a 4%). A solução de digluconato de clorexidina a 2% nem sempre está acessível ao paciente e o peróxido de hidrogênio 10V apresentou resultado inferior comparado aos outros.

Baseado nos resultados deste estudo podemos concluir que todos os produtos testados apresentam algum efeito antifúngico contra *Candida albicans* em resina acrílica polimerizada em microondas. Entretanto os melhores resultados foram obtidos para o digluconato de clorexidina 2%, a solução de hipoclorito de sódio 1% e o vinagre (ácido acético a 4%).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por agentes de desinfecção de resina acrílica de base de prótese deve levar em conta o efeito antifúngico elevado contra *Candida albicans* e o custo que deve ser acessível à população. Pois sem considerar estes dois fatores, o agente pode ser pouco efetivo ou o paciente pode não realizar a desinfecção pelo custo do produto a ser adquirido.

Baseado nos resultados do presente estudo, os agentes mais efetivos contra *Candida albicans* em resina acrílica polimerizada em microondas foram digluconato de clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 1% e o vinagre (ácido acético 4%). O peróxido de hidrogênio 10V apresentou a menor atividade antifúngica após dez minutos de imersão dos corpos de prova na solução.

Dentro das limitações desta pesquisa, podemos concluir que as soluções digluconato de clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 1% e vinagre (ácido acético 4%) podem ser indicados como um método auxiliar na desinfecção de próteses de resina acrílica polimerizadas por microondas, levando em consideração: os efeitos adversos de cada solução e o perfil sócio-econômico do paciente.

REFERÊNCIAS

AZZARRI, M. Effect of the curing conditions on the properties of an acrylic denture base resin microwave- polymerised. **J. Dent.**, Guildford v. 23, no. 7, p.463-468, Sep. 2003.

BARBOSA, D.B., et al. Flexural strength of acrylic resins polymerized by different cycles. **J. Appl. Oral Sci.** Bauru, v.15, no.5, p. 424-428, Sep./Oct. 2007.

BASSON, N.J.; QUICK, A.N.; THOMAS, C.J. Household products as sanitising agents in denture cleansing. **J. Dent. Assoc. S. Afr.** Cape Town, v.47, no. 10, p. 437-439, Oct. 1992.

BELL, J.A. et al. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.61, no. 5, p. 580-583, May 1989.

BRAUN, K.O; MELLO, J.A; RACHED, R.N; DEL BEL CURY A.A. Surface texture and some properties of acrylic resins submitted to chemical polishing. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.30, no. 1, p. 91-98, Jan. 2003.

CANNON, R. D.; CHAFFIN, W. L. Oral Colonization By *Candida albicans*. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** Boca Raton, v. 10, n. 3, p. 359-383, 1999.

CAWSON, R. A.; CURSON, I.; The effectiveness of some antiseptics on the oral mucous membrane. **Br. Dent. J.**, London, v. 106, no. 1, p. 208-211, Oct.1959.

CHASSOT, A. L. C.; POISL, M. I. P.; SAMUEL, S. M. W. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for descontamination of acrylic resins. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 17, no. 2, p. 117-121, 2006.

CHAU, V.B., et al. In-depth disinfection of acrylic resins. **J. Prosthet. Dent.** St. Louis, v. 74, no. 3, p. 309-313, Sep. 1995.

DAVIES, G. E.; et al. Laboratory investigation of a new anti-bacterial agent of a high potency. **Br. J. Pharmacol.**, London, vo. 9, no. 2, p. 192-196, June 1954.

DENARDI, B. B. O uso da clorexidina na prática odontológica. **Rev. da APCD**, São Paulo, v. 48, n. 2, p.1279-1285, mar./abr. 1994.

DILLS, S.S; OLSHAN. A.M.; GOLDNER S.; BROGDON, C. Comparison of the antimicrobial capability of an abrasive paste and chemical-soak denture cleaners. **J. Prosthet. Dent.** St Louis, v. 60, no. 4, p. 467-470, Oct. 1988.

ESTRELA, C.R., et al., Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. **Braz Dent J.** Ribeirão Preto, v. 14, n. 3, p. 187-192, 2003.

FORTES, C.B.B. **Caracterização e propriedades das resinas acrílicas de uso odontológico: um enfoque voltado para a biossegurança.** 2007, 122 f. Tese de Doutorado em Materiais Dentários. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

INTERNATIONAL STANDARTIZATION FOR ORGANIZATION; 1567: Dentistry – Denture base polymers. 3rd ed. Switzerland, 1999.

JORGE, J.J.R. Oral mucosal health and disease in institutionalized elderly in Brazil. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 19, no. 3, p. 173-175, June 1991.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E., ARIKAN. A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.29, no. 3, p. 300-304, Mar. 2002.

LOPES, D.M., et al. Avaliação da influência do ácido cético na eficiência da higienização de próteses totais. **Rev. Odontol. da UNICID**, São Paulo, v. 21, no. 2, p. 150-154, maio/ago 2009.

MAGROFILHO, O. et al. Lavagem das mãos com soluções de PVP-I, clorexidina e sabão líquido: estudo microbiológico. **Rev. da APCD**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 25-28, jan./fev. 2000.

MANO, E.B; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgar Blücher; 1999. 122 p.

MIMA, E. G. D. O. et al. Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole-resistant *Candida albicans*: in vitro study. **Mycoses**, Berlin, v. 54, no.5, p. 506-512, Sep. 2011.

MONTAGNER, H. et al. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 17, n. 5, p. 432-435, sep. 2009.

NEPPELENBROEK, K. et al. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis v. 93, no.2, p. 171-176, Fev. 2005.

NIKAWA, H. et al., Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture living materials caused by denture cleansers in vitro. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 30, no. 3, p. 243-250, Mar. 2003.

NISHII M. Curing of denture base resins with microwave irradiation: with particular reference to heat-curing resins. **J. Osaka Dent. Univ.** Osaka, v. 2, no.1, p. 23- 40, Mar. 1968.

PARANHOS, H. D. F. O. et al. Comparison of physical and mechanical properties of microwave-polymerized acrylic resin after disinfection in sodium hypochlorite solutions. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 4, p. 331-335, sep. 2009.

PARANHOS, H. F. O. et al. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. **J. Prosthodont.**, Copenhagen, v. 18, no. 5, p. 427-431, July 2009.

PAVARINA, A. C. et al. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. **J. Oral Rehabil.**, Oxford v. 30, no.5, p. 532-536, May 2003.

PINTO, T. M. S. et al. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* sp. in complete denture wearers. **J. Appl. Oral. Sci.**, Bauru v. 16, n. 6, p. 385-390, nov./dez. 2008.

RIBEIRO, S. K.; BUSSADORI, S. K. Comparação entre o gel de clorexidina e o verniz de flúor na contagem salivar de *S. mutans*. **Rev. Paul. Odontol.**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 48-52, jul./ago. 2000.

SESMA, N. et al. Eficiência de métodos caseiros de higienização e limpeza de próteses parciais removíveis. **Rev da APCD**, São Paulo, v. 53, n. 6, p. 463-468, nov./dez. 1999.

SILVA, F. C. et al. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. **J. Prosthodont.** Copenhagen, v. 17, no. 8, p. 627-633, Dec. 2008.

SILVA, E. J. S. et al. Avaliação microbiológica de eficácia imediata de 04 agentes anti-sépticos utilizados na degermação das mãos. **Rev. Bras. Cir. Implant.**, Curitiba, v. 7, n. 27, p. 20-27, jul./ago. 2000.

SILVA, C. R. G.; JORGE, A. O. C. Avaliação de desinfetantes de superfície utilizados em odontologia. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, no. 2, p. 107-114, abr.-jun. 2002.

SOUSA, F. A. C. G. D. et al. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 23, no. 4, p. 381-395, out.-dez. 2009.

SHAY K. Denture Hygiene: a review and update. **J. Contemp. Dent. Pract.** Cincinnati, v.1, no.2, p. 28-41, Feb. 2000.

SKJORLAND, K.K.; RYKKE, M.; SONJU, T. Rate of pellicle formation in vivo. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v.53, no. 6, p. 358-62, Dec. 1995.

ULUDAMAR, A. et al. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on *Candida albicans* in patients with denture stomatitis. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 18, n. 3, p. 291-296, maio/jun. 2010.

WEBB, B.C; THOMAS, C.J.; WHITTLE, T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. **Gerodontology**, Oxford, v.22, no. 3, p. 168-176, Sep. 2005.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral Candidosis. **J. Oral Microbiol.**, Jarfalla, v.28, no.3, Jan. 2001. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3087208/?tool=pubmed>> Acesso em: 10 jun. 2011.

YANNIKAKIS, S. et al. Evaluation of porosity in microwave-processed acrylic resin using a photographic method. **J. Prosthet. Dent.** St. Louis, v. 87, no. 3, p. 613-619, June 2002.

**ANEXO - Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Pesquisa de Odontologia,
FO-UFRGS**

Projeto Nº: 21686

Título: EFICACIA ANTIFUNGICA DE DIFERENTES AGENTES QUIMICOS DE DESINFECCAO EM RESINA ACRILICA PARA BASE DE PROTESE

COMISSAO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA: Parecer

Este estudo in vitro visa avaliar a eficácia antifúngica sobre *Candida albicans* de quatro agentes químicos no processo de desinfecção de resina acrílica para base de prótese dental. Sessenta corpos de prova (CP) serão confeccionados em resina acrílica e serão divididos em 4 grupos testes (hipoclorito de sódio 0,5%; digluconato de clorexidina 2%; ácido acético 4%; peróxido de hidrogênio 10v) e 2 grupos controle (positivo e negativo). Todos os CP serão contaminados com uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 18804) exceto os do controle negativo. O crescimento de *Candida* será avaliado em meio BHI através da turvação do mesmo. O projeto encontra-se adequadamente delineado e bem descrito.