

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

EDUARDA MARTINS MENDES

EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA COMBINAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO E
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO ALTERNATIVA PARA DESINFECÇÃO DE
RESINA ACRÍLICA - ESTUDO IN VITRO

Porto Alegre
2016

EDUARDA MARTINS MENDES

EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA COMBINAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO E
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO ALTERNATIVA PARA DESINFECÇÃO DE
RESINA ACRÍLICA - ESTUDO IN VITRO

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 Cristiane Machado Mengatto
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Mendes, Eduarda Martins

EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA COMBINAÇÃO DE ÁCIDO
ACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO COMO ALTERNATIVA PARA
DESINFECÇÃO DE RESINA ACRÍLICA - ESTUDO IN VITRO /
Eduarda Martins Mendes. -- 2016.

32 f.

Orientadora: Cristiane Machado Mengatto.

Coorientador: Rodrigo Alex Arthur.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2016.

1. Desinfecção. 2. Resina Acrílica. 3. Prótese
Dental. 4. Ácido Acético. 5. Peróxido de Hidrogênio.
I. Mengatto, Cristiane Machado, orient. II. Arthur,
Rodrigo Alex, coorient. III. Título.

Dedico esse trabalho

Aos meus pais, **Herton e Sandra**, por sempre manterem meus pés (tão sonhadores) no chão e, ao mesmo tempo, incentivarem à superação de dificuldades e à realização de minhas conquistas.

À minha irmã, **Fernanda**, por sua amizade incondicional em todos os momentos da minha vida e apoio nos momentos de fraqueza para realização deste sonho.

Às colegas de graduação, em especial, **Franciele Alberton, Raphaela Milão e Isis Vidaletti** pelo apoio, convívio e amizade em todos os momentos da graduação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **professora Cristiane Mengatto**, pela oportunidade de participar dessa pesquisa tão importante no meio acadêmico, confiando em meu trabalho e permitindo autonomia para condução dessa pesquisa. Obrigada pela orientação ao longo do desenvolvimento deste trabalho, por todos os ensinamentos e aconselhamentos e pela amizade ao longo desses anos de convívio.

Ao professor **Rodrigo Alex Arthur**, pela coorientação do trabalho e participação desde o seu planejamento, transmitindo todo o seu conhecimento e sabedoria. Obrigada por possibilitar a integração entre as áreas de Prótese e Microbiologia.

À pós-doutoranda **Thais Negrini**, por seu empenho e dedicação durante as etapas de execução dessa pesquisa. Agradeço imensamente seus ensinamentos que fizeram diferença ao longo de todas as etapas do estudo e farão diferença em minha vida.

Aos queridos colegas de Laboratório de Ensino e Pesquisa em Prótese (LAEPP), **Isis Vidaletti, Luan Lopes e Priscila Flores**, pelos momentos de amizade e compreensão durante a pesquisa.

Agradeço a todos os colegas, funcionários e demais professores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) que estavam sempre disponíveis para ajudar. Em especial, à **Luisa Mercado** por sua paciência, atenção e colaboração durante todo o desenvolvimento da pesquisa e, também, por sua amizade e carinho.

Têm coisas que tem seu valor
Avaliado em quilates,
Em cifras e fins...
E outras não têm o apreço
Nem pagam o preço que valem pra mim

Luiz Marengo

RESUMO

MENDES, Eduarda Martins. **Eficácia antimicrobiana da combinação de ácido acético e peróxido de hidrogênio como alternativa para desinfecção de resina acrílica - estudo in vitro**. 2016. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

O ácido peracético tem comprovada eficácia antimicrobiana para a desinfecção de próteses dentais, mas o alto custo é um limitante ao seu uso popular como método de desinfecção. Visto que os componentes reacionais do ácido peracético são de baixo custo e fácil acesso à população, a combinação da água oxigenada (peróxido de hidrogênio 3%) e do vinagre (ácido acético 4%) poderia representar uma alternativa como solução antimicrobiana. No entanto, essa combinação das duas soluções nunca foi testada contra micro-organismos orais. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana da mistura de água oxigenada com vinagre em crescimento planctônico e em formação de biofilme específico de *Candida albicans* ou *Staphylococcus aureus* sobre resina acrílica. Para o primeiro experimento, os micro-organismos foram inoculados em crescimento planctônico de *C.albicans* e *S.aureus*, submetidos ao contato com as seguintes soluções por 10 minutos (n=3): GP1: 50% de vinagre + 50% de água oxigenada; GP2: 25% de vinagre + 75% de água oxigenada; GP3: 75% de vinagre + 25% de água oxigenada; GP4: 50% de vinagre + 50% de água destilada; GP5: 25% de vinagre + 75% de água destilada; GP6: 75% de vinagre + 25% de água destilada; GP7: 50% água oxigenada + 50% de água destilada; GP8 25% de água oxigenada + 75% de água destilada; GP9: 75% de água oxigenada + 25% de água destilada; GP10: água destilada; GP11: hipoclorito de sódio 0,5%; GP12: ácido peracético 0,2%. Para o segundo experimento, foram feitos 180 corpos-de-prova (30x5mm) de resina acrílica termopolimerizada por energia de micro-ondas. Os corpos-de-prova foram inoculados para formação de biofilme de *C.albicans* (n = 80) ou *S.aureus* (n = 80) e randomicamente imersos por 10 minutos nas soluções dos seguintes grupos: GB1: 50% de vinagre + 50% de água oxigenada; GB2: 25% de vinagre + 75% de água oxigenada; GB3: 75% de vinagre + 25% de água oxigenada; GB4: vinagre; GB5: água oxigenada; GB6: água destilada; GB7: hipoclorito de sódio 0,5%; GB8: ácido peracético 0,2%. Após a imersão, a eficácia antimicrobiana foi avaliada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias e comparada por meio do teste de Kruskal Wallis com *post-hoc* de Dunnet ou ANOVA com *post-hoc* de Tukey, ambos com o nível de significância em 5%. Em meio planctônico ou em crescimento de biofilme de *C.albicans* ou *S.aureus*, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre a eficácia antimicrobiana da mistura de vinagre e água oxigenada, independente da concentração utilizada (GP1, GP2 e GP3; GB1, GB2 e GB3), em comparação às soluções comerciais de hipoclorito de sódio 0,5% ou de ácido peracético 0,2% (GP11 e GP12; GB7 e GB8). Para o biofilme de *S.aureus*, observou-se que a água oxigenada (GB5) foi tão eficaz quanto as soluções comerciais testadas GB7 e GB8 ($p>0,05$). Concluiu-se que a combinação do vinagre com água oxigenada é eficaz contra os microorganismos testados, com eficácia antimicrobiana similar às das soluções de ácido peracético 0,2% e de hipoclorito de sódio 0,5%, em crescimento planctônico ou em biofilme de *C.albicans* ou *S.aureus*.

Palavras-chave: Desinfecção. Resina Acrílica. Prótese Dental. Estomatite Protética. Ácido Peracético. Peróxido de Hidrogênio.

ABSTRACT

MENDES, Eduarda Martins. **Antimicrobial efficacy of hydrogen peroxide and vinegar combination**. 2016. 32 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial efficacy of hydrogen peroxide and vinegar combination in planktonic growth and biofilm formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* on acrylic resin disks. For the first experiment, strains of *S.aureus* or *C.albicans* were inoculated for planktonic growth in tubes and the following solutions were tested in triplicates: GP1: 50% vinegar + 50% hydrogen peroxide (HP); GP2: 25% vinegar + 75% HP; GP3: 75% vinegar + 25% HP; GP4: 50% vinegar + 50% water; GP5: 25% vinegar + 75% water; GP6: 75% vinegar + 25% water; GP7: 50% HP + 50% water; GP8: 25% HP + 75% water; GP9: 75% hydrogen peroxide + 25% water; GP10: water; GP11: 0.5% sodium hypochlorite; GP12: 0.2% peracetic acid. For the second experiment, 160 heat-polymerized acrylic resin disks (30x5mm) were fabricated. Specimens were randomized according to the following groups and inoculated with strains of either *C.albicans* (n = 80) or *S.aureus* (n = 80): GB1: 50% vinegar + 50% HP; GB2: 25% vinegar + 75% HP; GB3: 75% vinegar + 25% HP; GB4: vinegar; GB5: HP; GB6: water; GB7: 0.5% sodium hypochlorite; GB8: 0.2% peracetic acid. Antimicrobial efficacy was evaluated by counting colony-forming units and the results were compared using Kruskal Wallis test, with post-hoc Dunnet or ANOVA with post-hoc Tukey, with 5% significance. For both planktonic growth and biofilm formation of *S.aureus* and *C.albicans*, there was no significant statistical difference ($p>0.05$) among the mixtures of vinegar and HP, regardless of the tested concentrations, and the commercial solutions of 0.5% sodium hypochlorite or 0.2% peracetic acid. For biofilm formation of *S.aureus*, the solution of HP (GB5) was as effective as the commercial solutions (GB7 and GB8) ($p>0.05$). It was concluded that the mixture of vinegar and hydrogen peroxide is effective against the tested microorganisms, with similar antimicrobial efficacy to that of 0.2% peracetic acid or 0.5% sodium hypochlorite for both planktonic and biofilm growth of *C.albicans* or *S.aureus*.

Keywords: Disinfection. Acrylic Resin. Dental Prosthesis. Denture Stomatitis. Peracetic Acid. Hydrogen Peroxide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para <i>C.albicans</i> em cultura planctônica.....	19
Tabela 2 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para <i>S.aureus</i> em cultura planctônica.....	20
Tabela 3 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para <i>C.albicans</i> em cultura de biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica.....	21
Tabela 4 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para <i>S.aureus</i> em cultura de biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis Of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain and Heart Infusion Broth
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
GB	Grupo Biofilme
GP	Grupo Planctônico
kgf	Kilograma-força
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
PEPI	Epidemiologic Perspectives & Innovations
rpm	rotações Por Minuto
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WINPEPI	PEPI-for-Windows
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Delineamento do experimento com crescimento planctônico de micro-organismos.....	14
3.2	Delineamento do experimento com formação de biofilme sobre os corpos-de-prova de resina acrílica.....	15
3.2.1	Desinfecção.....	17
3.3	Análise estatística dos dados.....	18
4	RESULTADOS	19
4.1	Experimento 1 - cultura planctônica.....	19
4.2	Experimento 2 - formação de biofilme sobre os corpos-de-prova de resina acrílica.....	21
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO ..	28
	ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	30

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da limpeza da prótese dental é remover biofilme microbiano, restos de alimentos e depósitos de leveduras a fim de prevenir a instalação de infecções orais. No entanto, um dos principais problemas enfrentados pelos pacientes edêntulos totais é a dificuldade de controle da estomatite protética, uma inflamação oral de natureza multifatorial que afeta aproximadamente 65% destes indivíduos (BRONDANI; SAMIM; FENG, 2012; RIBEIRO et al., 2009; ROSSATO et al., 2011; SKUPIEN et al., 2013)

A utilização contínua das próteses mucossuportadas e a sua higienização precária são considerados os principais fatores que favorecem o estabelecimento da estomatite protética. A facilidade pela qual os depósitos orgânicos se acumulam nas próteses pode variar entre indivíduos e pode ser afetada por diversos fatores como a diminuição da resposta imunológica, a presença de diabetes mellitus, as deficiências nutricionais, a alteração de fluxo e composição da saliva, a ingestão rica em carboidratos, o uso prolongado de antibióticos, a presença de hipertensão ou câncer (BRONDANI; SAMIM; FENG, 2012; NEPPELENBROEK et al., 2008; PINTO et al., 2008; SANITA et al., 2012).

Além da suscetibilidade sistêmica do indivíduo, fatores locais relacionados ao tempo de uso da prótese e ao aumento da porosidade e rugosidade da resina acrílica também podem estar relacionados à recorrência da estomatite protética (NEPPELENBROEK et al., 2008; SANITA et al., 2012; SENNA et al., 2012; SILVA et al., 2012). A superfície de uma prótese dental com rugosidade aumentada pode atuar como reservatório de micro-organismos e leveduras, agravando uma condição pré-existente (JAGGER et al., 2002; SILVA et al., 2012).

Diversos métodos de limpeza mecânica e de desinfecção química foram testados quanto à sua eficácia para remoção microbiana (BANTING; HILL, 2001). O método de limpeza mais comumente utilizado é o mecânico, envolvendo a escovação com dentifrício. Este representa um grande desafio para os idosos edêntulos com a capacidade motora e destreza manual comprometidas (PINTO et al., 2008; ROSSATO et al., 2011). Além disso, a maioria dos dentifrícios são abrasivos com potencial de criar microrugosidades nas superfícies das próteses dentárias de resina acrílica que, posteriormente, favorecem a deposição de micro-organismos (BANTING; HILL, 2001). Os métodos químicos constituem a utilização de produtos para a imersão das próteses a fim de complementar a higienização mecânica promovida pela escovação. Várias soluções têm sido sugeridas para a desinfecção de próteses dentais, tais como o perborato de sódio, o hipoclorito de sódio, os ácidos clorídrico, fosfórico e

benzoico, o digluconato de clorexidina, o ácido acético e o ácido peracético (HAHNEL et al., 2012; ROSSATO et al., 2011; SILVA et al., 2012; SKUPIEN et al., 2013). Entretanto, algumas soluções desinfetantes podem causar efeitos deletérios sobre a resina acrílica, como alterações de cor (descoloração, branqueamento ou manchamento), alteração na rugosidade superficial (aumento da rugosidade) e, também, oxidação do metal presente em grampos e conectores de próteses parciais removíveis, por exemplo (HAHNEL et al., 2012; RIBEIRO et al., 2009; ROSSATO et al., 2011; SILVA et al., 2012). Em vista disso, alternativas que possam suprir os requisitos para uma desinfecção eficaz sem causar alterações nas propriedades da resina acrílica têm sido investigadas (RIBEIRO et al., 2009; SILVA et al., 2008).

De acordo com a literatura, uma das soluções de imersão mais eficaz para a desinfecção de próteses dentais é o hipoclorito de sódio devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiano em um curto período. No entanto, apesar da sua boa eficiência antimicrobiana e seu baixo custo, o hipoclorito de sódio tem propriedades corrosivas que podem causar irritação à mucosa bucal e promover alterações de cor da resina acrílica (CHASSOT; POISL; SAMUEL, 2006; SILVA et al., 2008). Outra solução utilizada profissionalmente para a desinfecção de próteses, por ter boa eficácia antimicrobiana e ser capaz de esterilizar (ação esporicida), é o glutaraldeído, porém a sua alta toxicidade é considerada uma limitação para sua utilização caseira (CHASSOT; POISL; SAMUEL, 2006; SILVA et al., 2008), além de ter sua venda livre recentemente proibida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007). Segundo Chassot, Poisl e Samuel (2006), o ácido peracético é uma solução bastante empregada na descontaminação e esterilização de equipamentos médico-hospitalares, por ter amplo espectro antimicrobiano e não produzir subprodutos tóxicos, já que seu mecanismo de ação envolve a decomposição em ácido acético, oxigênio e água. Entretanto, o ácido peracético não é considerado uma solução de uso caseiro e há uma escassez de estudos que avaliem a eficácia do ácido peracético na desinfecção de próteses dentais. Um estudo, utilizando corpos-de-prova de resina acrílica ativada quimicamente ou ativada por energia de micro-ondas, mostrou que o ácido peracético a 0,2% usado por no mínimo 5 minutos é eficaz para a desinfecção de contaminações por saliva humana e por micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* (CHASSOT; POISL; SAMUEL, 2006).

Apesar das vantagens do ácido peracético para o uso clínico rotineiro, o alto custo do produto no mercado é um limitante ao seu uso popular como método de desinfecção de próteses dentais. A partir do conhecimento sobre a composição química do ácido peracético $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$ (SILVA, 2010), propôs-se estudar a mistura caseira de suas

substâncias reagentes, a saber o ácido acético (CH_3COOH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O vinagre, composto por ácido acético a 4%, e a água oxigenada, composta por peróxido de hidrogênio a 3%, são soluções de uso caseiro, e já foram aplicadas isoladamente na Odontologia como agentes antimicrobianos, mas nunca combinados em uma mesma mistura. O ácido acético, um dos componentes do ácido peracético, é um composto resultante de fermentação alcoólica (PINTO et al., 2008). A forma de ácido acético mais comumente encontrada no mercado é o vinagre, que apresenta um baixo custo quando comparado à outras soluções (PINTO et al., 2008; SILVA et al., 2008). No entanto, há poucos estudos na literatura sobre a eficácia do emprego do vinagre como método de desinfecção química de próteses dentais. Um estudo *in vivo* mostrou que o vinagre a 1% não foi capaz de remover eficientemente a *Candida albicans*, principal agente etiológico da estomatite induzida por prótese (PINTO et al., 2008). O peróxido de hidrogênio, outro componente principal do ácido peracético, está disponível comercialmente sob a forma de pós ou pastilhas que se tornam soluções alcalinas de peróxido de hidrogênio, quando dissolvidas em água pelo paciente (KANNO et al., 2012; SKUPIEN et al., 2013). Embora essa aplicação do peróxido de hidrogênio para a limpeza de próteses dentais tenha se tornado amplamente utilizada pelos pacientes, estudos mostram que esse composto é ineficaz como método de desinfecção (KANNO et al., 2012; ROSSATO et al., 2011).

Um estudo, realizado por Bell, Cutter e Sumner (1997) no Departamento de Ciência Alimentícia e Tecnologia da Universidade de Nebraska - Lincoln nos EUA, testou a eficácia da mistura do ácido acético a 1% e do peróxido de hidrogênio a 3% na descontaminação de carne inoculada com *Escherichia coli*, *Listeria innocua* e *Salmonella wentworth* e mostrou que a combinação dessas duas soluções reduziu as contagens microbianas quando comparado às mesmas soluções utilizadas de maneira isoladas. Visto que os componentes do ácido peracético são de baixo custo e fácil acesso à população, a mistura caseira do ácido acético (vinagre) e do peróxido de hidrogênio (água oxigenada) pode ser uma alternativa como solução desinfetante. No entanto, esta combinação das duas soluções nunca foi testada contra micro-organismos detectados na cavidade oral, tais como a *Candida albicans*, um dos principais agentes etiológicos da estomatite protética, e o *Staphylococcus aureus*, um dos principais causadores de doenças infecciosas graves, especialmente em pacientes idosos ou institucionalizados.

2 OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana da mistura de água oxigenada com vinagre contra os micro-organismos *Candida albicans* ou *Staphylococcus aureus*, em crescimento planctônico e em formação de biofilme específico sobre resina acrílica.

A hipótese nula levantada para este estudo é que a mistura de ácido acético com o peróxido de hidrogênio tem eficácia antimicrobiana similar à do ácido peracético a 0,2% e do hipoclorito de sódio a 1% contra os micro-organismos *C.albicans* ou *S.aureus*, em crescimento planctônico e em biofilme específico formado sobre resina acrílica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para todos os experimentos realizados, foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). As cepas foram reativadas a partir de estoques congelados e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas em meio Ágar Sabouraud (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para *C.albicans* e Ágar Brain and Heart Infusion Broth (BHI) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para *S.aureus*. Após a incubação, as colônias foram transferidas para tubos plásticos do tipo Falcon contendo 10 mL de BHI caldo (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) com 1% de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

O preparo do inóculo foi feito separadamente para cada micro-organismo. Para tanto, os tubos foram centrifugados (modelo AS2-IPM, Cientec, Minas Gerais, Brasil) a 3.042 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionado 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%). A turbidez da suspensão foi ajustada para 0,5 com a escala de MacFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), o que corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL.

As soluções de desinfecção utilizadas no estudo foram: água oxigenada 10 volumes (peróxido de hidrogênio 3%, Farmax, Minas Gerais, Brasil), ácido peracético 0,2% (Voxilon Esterilizante Thech, São Paulo, Brasil), hipoclorito de sódio 0,5% (Líquido de Dakin, Asfer, São Paulo, Brasil) e vinagre de vinho branco (ácido acético 4%, Castelo, São Paulo, Brasil).

3.1 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO COM CRESCIMENTO PLANCTÔNICO DE MICRO-ORGANISMOS

Após o preparo do inóculo, foi transferido 1 mL da suspensão de *C.albicans* (n=36) ou *S.aureus* (n=36) para microtubo de 2 mL (Eppendorf®, Hamburg, Germany). Os microtubos foram centrifugados (modelo AS2-IPM, Cientec, Minas Gerais, Brasil) a 3.042 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, o sedimento de células foi lavado com solução salina (NaCl 0,9%) e novamente centrifugado nas mesmas condições. Ao sedimento de células, foi adicionado 1 mL de cada solução a ser testada e o tempo de contato entre as soluções e os micro-organismos foi padronizado em 10 minutos. Para cada micro-organismo, os 36 microtubos foram distribuídos aleatoriamente em Grupos Planctônicos (GP), segundo a solução utilizada para desinfecção: GP1 (n=3): mistura preparada a partir de 5 mL de vinagre e 5 mL

de água oxigenada; GP2 (n=3): mistura de 2,5 mL de vinagre e 7,5 mL de água oxigenada; GP3 (n=3): mistura de 7,5 mL de vinagre e 2 mL de água oxigenada; GP4 (n=3): 5 mL de vinagre e 5 mL de água destilada; GP5 (n=3): 2,5 mL vinagre e 7,5 mL de água destilada; GP6 (n=3): 7,5 mL de vinagre e 2,5 mL de água destilada; GP7 (n=3): 5 mL de água oxigenada e 5 mL de água destilada; GP8 (n=3): 2,5 mL de água oxigenada e 7,5 mL de água destilada; GP9 (n=3): 7,5 mL de água oxigenada e 2,5 mL de água destilada; GP10 (n=3): água destilada estéril (controle); GP11 (n=3): hipoclorito de sódio 0,5%; GP12: ácido peracético 0,2%.

Após o tempo de ação das soluções, os microtubos foram submetidos à agitação contínua em agitador de tubos (AP-56, Phoenix, São Paulo, Brasil), durante 01 minuto, e realizou-se a diluição seriada em microtubos contendo 0,9 mL de solução salina (NaCl 0,9%), seguindo-se cinco diluições subsequentes (10^{-1} a 10^{-5}). Posteriormente, após agitação, foram coletados 25 μ L de cada diluição (duplicata) e semeados em placas petri contendo meio Ágar Sabouraud (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para *C.albicans* e Ágar BHI (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para *S.aureus*. O período de incubação das placas foi de 24 horas em estufa a 37°C e o resultado foi avaliado através de contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.2 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO COM FORMAÇÃO DE BIOFILME SOBRE OS CORPOS-DE-PROVA DE RESINA ACRÍLICA

Para esse experimento, foi realizado cálculo amostral através do software WINPEPI 11.45 (PEPI-para-Windows) a partir da variabilidade encontrada entre as médias de dois grupos independentes, utilizando-se desvios-padrões do estudo de Vieira et al. (2010) de 0,01 (hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos) e 5,40 (água destilada por 15 minutos) com significância estatística de 5% e poder em 90%. O programa computou que para uma diferença de 6 células/mL, havia a necessidade de no mínimo 10 amostras por grupo.

Assim, foram confeccionados 180 corpos-de-prova circulares medindo 30 mm de diâmetro e 5 mm de altura em resina acrílica termopolimerizada por energia de micro-ondas (Onda Cryl, Artigos Odontológicos Clássico Ltd., São Paulo, Brasil). Os padrões-de-cera foram confeccionados em cera número 7 (Lysanda, São Paulo, Brasil) a partir de uma matriz metálica e incluídos com gesso pedra tipo IV (Vigodent, Herostone Coltene, Rio de Janeiro, Brasil) em muflas poliestireno (Onda-Cryl, São Paulo, Brasil). A resina acrílica foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante e prensada por 30

minutos a 500 kgf. A polimerização foi realizada em um forno de micro-ondas (Electrolux, MEF41, Pinhais, Brasil) durante 3 minutos a 40% de potência, 4 minutos de pausa seguidos de 3 minutos a 90% de potência. As muflas foram deixadas sobre a bancada por 2 horas para resfriamento, a resina acrílica em excesso foi removida com o uso de uma fresa de tungstênio em baixa rotação e o acabamento e polimento foram realizados de maneira padronizada em politriz (modelo APL-4, Arotec, São Paulo, Brasil) por 30 segundos com lixas d'água (Norton, São Paulo, Brasil) nas granulações de #320, #400, #600 e #1200, totalizando 2 minutos, seguido de disco de feltro com pedra pomes (Polidental, São Paulo, Brasil) por 1 minuto e branco de Espanha (Quimidrol, Joinville, Brasil) por 1 minuto. Após o polimento, os corpos-de-prova foram armazenados em recipientes com água destilada à temperatura ambiente ($23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$) por 12 horas, para eliminação do monômero residual antes da realização dos procedimentos experimentais (SILVA, 2009).

Para garantir que não houvesse influência da rugosidade superficial da resina acrílica na adesão microbiana, todos os corpos-de-prova passaram por uma análise da rugosidade superficial com um perfilômetro (SE1700 Surfscorder, Kosaka Laboratory Ltd., Tóquio, Japão), com resolução de 0,01 mm, calibrado em comprimento de amostra de 0,8 mm, 2,4 mm de percussão de medida e 0,5 mm/s de velocidade (FERNANDES, 2011; SILVA, 2009).

Três leituras foram realizadas em cada corpo-de prova e um valor médio de rugosidade foi calculado (FERNANDES, 2011; SILVA, 2009). Dez corpos-de-prova com valor de rugosidade abaixo de $0,05 \mu\text{m}$ e acima de $0,15 \mu\text{m}$ foram descartados. Os corpos-de-prova restantes foram numerados, randomizados e distribuídos em 8 grupos com 10 corpos-de-prova para *C.albicans* e 8 grupos com 10 corpos-de-prova para *S.aureus*, utilizando o programa Research Randomizer na versão 4.0 (URBANIACK; PLOUSE, 2013). Os 160 corpos-de-prova foram colocados em bolsas Tyvek[®] (E.I. du Pont de Nemours and Company, EUA) e esterilizados utilizando peróxido de hidrogênio através do Sistema do Esterilizador STERRAD[®] 100NX[™] (Johnson e Johnson Medical GmbH, Germany), conforme o manual do fabricante.

Previamente à formação do biofilme sobre os corpos-de-prova, utilizou-se saliva preparada a partir da coleta de saliva estimulada de um único doador-fonte. O voluntário foi selecionado entre alunos de graduação ou pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFRGS, até 25 anos, sem qualquer especificação de raça ou grupo social, com condições de saúde bucal e sistêmica favoráveis e disponibilidade para comparecer ao local da pesquisa para coleta da saliva. Foram critérios de exclusão: relatar fluxo salivar reduzido, ser fumante, utilizar

aparelho ortodôntico, ter utilizado antibióticos, drogas ou medicamentos que afetem o fluxo salivar nos últimos seis meses. Uma vez selecionado, o voluntário recebeu informações verbais e escritas sobre os procedimentos do estudo e, para participar da pesquisa, assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A), conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFRGS (CEP UFRGS #714.626).

A estimulação do fluxo salivar foi realizada utilizando parafina inerte (Parafilm M[®], Laboratory Film, Chicago, EUA) A saliva produzida no primeiro minuto foi descartada e a saliva produzida nos minutos seguintes foi coletada e armazenada em um tubo Falcon de 15 mL. Os tubos foram mantidos em gelo e, em seguida, centrifugados (modelo AS2-IPM, Cientec, Minas Gerais, Brasil) a 3.042 rpm à temperatura ambiente, por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com uso de filtros de seringa com 0,22 µm de porosidade e 0,33mm de diâmetro (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e armazenado em tubo plástico estéril em freezer à -20°C até o uso.

A quantidade de 1 mL da saliva preparada foi pipetada em 160 poços de placas de cultura de fundo plano (EP-51-25243, EasyPath, São Paulo, Brasil). Os corpos-de-prova esterilizados foram transferidos com pinça estéril para cada poço de forma individual e posicionados horizontalmente com o lado polido voltado para cima. As placas, contendo os corpos-de-prova e a saliva preparada, foram submetidas à agitação suave e constante por 45 minutos a temperatura ambiente em agitador orbital (modelo Kline CT-150, Cientec, Minas Gerais, Brasil). Posteriormente, os 160 corpos-de-prova cobertos com saliva foram transferidos individualmente para uma placa contendo 1,5 mL de meio BHI 1% glicose e 0,5 mL de inóculo preparado de *C.albicans* (n=80) ou *S.aureus* (n=80) em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C em estufa durante 24 horas. Após, os corpos-de-prova foram transferidos para uma nova placa contendo 2 mL de BHI 1% de glicose em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C em estufa por mais 24 horas.

3.2.1 DESINFECÇÃO

Após o período de incubação, os corpos-de-prova foram transferidos individualmente com pinça estéril para novas placas de cultura contendo 2 mL de cada solução desinfetante, segundo a randomização dos Grupos Biofilme (GB): GB1 (n=10): mistura preparada de 5 mL de vinagre e 5 mL de água oxigenada; GB2 (n=10): mistura de 2,5 mL de vinagre e 7,5 mL de água oxigenada; GB3 (n=10): mistura de 7,5 mL de vinagre e 2 mL de água oxigenada; GB4

(n=10): vinagre; GB5 (n=10): água oxigenada; GB6 (n=10): água destilada estéril (controle); GB7 (n=10): hipoclorito de sódio comercial a 0,5% (Líquido de Dakin); GB8: ácido peracético a 0,2%.

O tempo de imersão dos corpos-de-prova imersos nas respectivas soluções foi padronizado em 10 minutos. Em seguida, os corpos-de-prova foram removidos das soluções desinfetantes, transferidos para tubos Falcon com 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e submetidos à agitação contínua em agitador de tubos (AP-56, Phoenix, São Paulo, Brasil), durante 01 minuto. Foram realizadas sete diluições decimais subsequentes (10^{-1} a 10^{-7}) e, posteriormente, foram coletados 25 μ l de cada diluição (duplicata) e semeados em placas petri contendo meio Ágar Saboraud (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) para *C.albicans* e Ágar BHI (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) para *S.aureus*. O período de incubação foi de 24h em estufa a 37°C e o resultado foi avaliado através de contagem das UFC.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A homogeneidade de distribuição dos resultados foi verificada por meio do teste de Shapiro Wilk. A eficácia antimicrobiana das diferentes soluções de desinfecção foi analisada estatisticamente, quando com distribuição não homogênea, por meio do teste de Kruskal Wallis em associação com o teste *post-hoc* de Dunnet para a comparação das medianas de *C.albicans*; e, quando com distribuição homogênea, por meio da Análise de Variância de uma via (ANOVA) em associação ao teste *post-hoc* de Tukey para comparação entre as médias de contagem de *S.aureus*. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software SPSS (versão 16.0 para Windows), com nível de significância estatística de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 – CULTURA PLANCTÔNICA

Nas culturas planctônicas de *C.albicans* (Tabela 1) e *S.aureus* (Tabela 2), as soluções testadas nos grupos GP1, GP2, GP3, GP11 e GP12 não apresentaram crescimento microbiano detectável, sem diferença estatística significativa entre os grupos acima ($p=1,000$), demonstrando que a mistura de vinagre e água oxigenada foi tão eficaz quanto as soluções de hipoclorito de sódio 0,5% e ácido peracético 0,2%.

Os grupos GP7, GP8 e GP9, diluições independentes de água oxigenada em água, apresentaram crescimento de *C.albicans* estatisticamente igual ao da água (GP10) ($p>0,05$). Já os grupos GP4, GP5 e GP6, diluições independentes de vinagre em água, apresentaram uma maior contagem de *C.albicans*, havendo diferença estatística em relação à água (GP10) ($p=0,001$).

Tabela 1 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para *C.albicans* em cultura planctônica (UFC)

Grupos	Mediana (erro padrão)	Mínimo – Máximo	Significância
GP1 50 % vinagre + 50% água oxigenada	0 ^A	0	
GP2 25% vinagre + 75% água oxigenada	0 ^A	0	
GP3 75% vinagre + 25% água oxigenada	0 ^A	0	
GP4 50% vinagre + 50% água	6,7 (0,03) ^B	6,6 - 6,7	
GP5 25% vinagre + 75% água	6,8 (0,02) ^B	6,7 - 6,8	
GP6 75% vinagre + 25% água	6,7 (0,02) ^B	6,7 - 6,8	
GP7 50% água oxigenada + 50% água	6,2 (0,08) ^{AB}	6,1 - 6,3	p = 0,001*
GP8 25% água oxigenada + 75% água	6,4 (0,07) ^{AB}	6,4 - 6,6	
GP9 75% água oxigenada + 25% água	5,1 (0,02) ^{AB}	5,1 - 5,1	
GP10 água	4,9 (0,64) ^{AB}	4,9 - 6,8	
GP11 hipoclorito de sódio 0,5%	0 ^A	0	
GP12 ácido peracético 0,2%	0 ^A	0	

* Diferença estatística significativa entre os grupos com uso do teste de Kruskal Wallis, para $p\leq 0,05$.

^{A,B} Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre dois grupos na comparação múltipla pelo teste *post-hoc* de Dunnet, para $p\leq 0,05$.

A água oxigenada com concentração igual ou superior a 50% em relação a água (GP7 e GP9) apresentou redução na contagem de *S.aureus*, sendo estatisticamente diferente da diluição de 25% de água oxigenada em água (GP8) e das diluições de vinagre em água (GP4, GP5 e GP6). A água (GP10) mostrou-se diferente estatisticamente das demais soluções, com uma maior contagem de *S.aureus* ($p \leq 0,05$).

Tabela 2 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para *S.aureus* em cultura planctônica (UFC)

Grupos		Mediana (erro padrão)	Mínimo - Máximo	Significância
GP1	50 % vinagre + 50% água oxigenada	0 ^A	0	p = 0,000*
GP2	25% vinagre + 75% água oxigenada	0 ^A	0	
GP3	75% vinagre + 25% água oxigenada	0 ^A	0	
GP4	50% vinagre + 50% água	6,4 (0,36) ^B	5,4 - 6,6	
GP5	25% vinagre + 75% água	6,7 (0,05) ^B	6,6 - 6,8	
GP6	75% vinagre + 25% água	6,2 (0,03) ^B	6,2 - 6,3	
GP7	50% água oxigenada + 50% água	4,1 (0,41) ^C	4,0 - 5,3	
GP8	25% água oxigenada + 75% água	6,8 (0,05) ^B	6,7 - 6,8	
GP9	75% água oxigenada + 25% água	4,3 (0,28) ^C	3,8 - 4,8	
GP10	água	7,6 (0,30) ^D	7, 6 - 8,5	
GP11	hipoclorito de sódio 0,5%	0 ^A	0	
GP12	ácido peracético 0,2%	0 ^A	0	

* Diferença estatística significativa entre os grupos com uso do teste de ANOVA para $p \leq 0,05$.

^{A,B} Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre dois grupos na comparação múltipla pelo teste *post-hoc* de Tukey, para $p \leq 0,05$.

4.2 EXPERIMENTO 2 - FORMAÇÃO DE BIOFILME SOBRE OS CORPOS-DE-PROVA DE RESINA ACRÍLICA

Para a formação de biofilme de *C.albicans* (Tabela 3) ou *S.aureus* (Tabela 4) sobre os corpos-de-prova, as soluções testadas nos grupos GB1, GB2, GB3, GB7 e GB8 não apresentaram crescimento bacteriano detectável ($p=1,000$), demonstrando que a mistura de vinagre e água oxigenada pode ser tão eficaz quanto as soluções comerciais de hipoclorito de sódio 0,5% e ácido peracético 0,2%. As três concentrações testadas (GB1, GB2 e GB3) foram igualmente eficazes quando comparadas entre si ($p=1,000$). Os grupos GB4 e GB5, soluções de vinagre e água oxigenada, respectivamente, apresentaram crescimentos microbianos estatisticamente iguais aos da água (GB10) ($p=1,000$).

Tabela 3 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para *C.albicans* em cultura de biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica (UFC)

Grupo	Mediana (erro padrão)	Mínimo – Máximo	Significância
GB1 50 % vinagre + 50% água oxigenada	0 ^A	0	p = 0.000*
GB2 25% vinagre + 75% água oxigenada	0 ^A	0	
GB3 75% vinagre + 25% água oxigenada	0 ^A	0	
GB4 vinagre	6,6 (0,6) ^B	1,30 - 7,3	
GB5 água oxigenada	5,4 (0,5) ^B	1,30 - 6,1	
GB6 água	7,1 (0 ,3) ^B	5,6 - 8,5	
GB7 hipoclorito de sódio 0,5%	0 ^A	0	
GB8 ácido peracético 0,2%	0 ^A	0	

* Diferença estatística significativa entre os grupos com uso do teste de Kruskal Wallis, para $p \leq 0,05$.

^{A,B} Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre dois grupos na comparação múltipla pelo teste *post-hoc* de Dunnet, para $p \leq 0,05$.

Para o *S.aureus*, o grupo da água oxigenada (GB5) não apresentou crescimento bacteriano detectável, sendo estatisticamente igual ao das misturas (GB1, GB2 e GB3) ($p=1,000$) e das soluções de hipoclorito de sódio 0,5% ($p=1,000$) e de ácido peracético 0,2% ($p=1,000$).

Tabela 4 - Eficácia antimicrobiana das soluções desinfetantes testadas, para *S.aureus* em cultura de biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica (UFC)

Grupo		Mediana (erro padrão)	Mínimo- Máximo	Significância
GB1	50 % vinagre + 50% água oxigenada	0 ^A	0	p = 0,000*
GB2	25% vinagre + 75% água oxigenada	0 ^A	0	
GB3	75% vinagre + 25% água oxigenada	0 ^A	0	
GB4	vinagre	6,2 (0,7) ^B	1,3 - 8,5	
GB5	água oxigenada	0 ^A	0	
GB6	água	5,3 (0,5) ^B	3,1 - 8,7	
GB7	hipoclorito de sódio 0,5%	0 ^A	0	
GB8	ácido peracético 0,2%	0 ^A	0	

* Diferença estatística significativa entre os grupos com uso do teste de ANOVA, para $p \leq 0,05$

^{A,B} Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre dois grupos na comparação múltipla pelo teste *post-hoc* de Tukey, para $p \leq 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O principal objetivo da limpeza das próteses dentais é a prevenção da instalação de infecções orais, entre elas, a estomatite protética que é uma das principais patologias que acometem pacientes edêntulos totais (ROSSATO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2009; SAMIM; FENG, 2012; SKUPIEN et al., 2013). Assim, o crescimento do biofilme bacteriano e o depósito de leveduras sobre a resina acrílica gera um grande desafio para a eficácia do método de remoção microbiana dessas próteses (BANTING; HILL, 2001).

O presente estudo mostrou que a mistura de vinagre (ácido acético 4%) e água oxigenada (peróxido de hidrogênio 3%) em três diferentes concentrações (GP1, GP2 e GP3 e GB1, GB2 e GB3) teve boa eficácia antimicrobiana em relação a micro-organismos orais comumente detectados na cavidade bucal, como a *Candida albicans* e o *Staphylococcus aureus*, o que pode representar uma alternativa para o emprego odontológico na desinfecção de próteses, em substituição às soluções disponíveis no mercado, sendo de baixo custo e fácil acesso à população. No entanto, este é o primeiro estudo que mostra o uso da combinação das duas soluções na Odontologia.

No presente estudo, a mistura de vinagre e água oxigenada mostrou-se mais eficaz do que as mesmas soluções utilizadas de maneira isoladas. Isso reforça achados prévios da literatura em que as soluções de vinagre e de água oxigenada foram estudadas de maneira isoladas e não mostraram eficácia antimicrobiana comprovada contra *C.albicans* (PINTO et al., 2008; SILVA et al., 2008). A água oxigenada é uma solução de uso comum e de fácil acesso à população e sua ação antimicrobiana ocorre devido à liberação de oxigênio gasoso, resultante da decomposição do peróxido de hidrogênio provocada por um produto orgânico (KANNO et al., 2012). A água oxigenada, comumente encontrado na forma de pós e pastilhas, mostra-se também insuficiente como método de desinfecção para *C.albicans* (KANNO et al., 2012; ROSSATO et al., 2011). Entretanto, em relação ao *S.aureus*, nota-se que há eficácia antimicrobiana quando usado de maneira isolada ou diluído em água com concentração acima de 50%.

A mistura de vinagre e água oxigenada mostrou-se tão eficaz quanto o hipoclorito de sódio 0,5% (Líquido de Dakin), usualmente utilizado na Odontologia para a desinfecção de próteses dentais e considerado a solução de imersão mais eficaz até o momento (SILVA et al., 2008). Atualmente, é a solução recomendada para a desinfecção de próteses removíveis sem

metal, mesmo sabendo-se de seus efeitos deletérios, como a corrosão do metal nas próteses parciais removíveis ou, até mesmo, a irritação da mucosa oral devido à sua citotoxicidade (FERREIRA et al., 2009). Por isso, o presente estudo adotou a solução comercial de hipoclorito de sódio a 0,5% com tempo de imersão de 10 minutos (ROSSATO et al., 2011; SKUPIEN et al., 2013) como método padrão-ouro de desinfecção. Essa concentração alcalina é descrita como eficaz e sem potencial de causar danos à superfície da resina acrílica, geralmente, causada por concentrações mais elevadas (ROSSATO et al., 2011; SKUPIEN et al., 2013). A mistura de vinagre e água oxigenada também se mostrou tão eficaz quanto o ácido peracético 0,2%, que é uma solução bastante empregada na descontaminação e esterilização de equipamentos médico-hospitalares devido ao seu amplo espectro antimicrobiano e, também, por ter como vantagem não gerar subprodutos tóxicos (CHASSOT; POISL; SAMUEL, 2006). Entretanto, apesar da eficácia do ácido peracético, o alto custo do produto no mercado é um fator limitante ao acesso popular como solução desinfecção de próteses dentais. Já a mistura de vinagre e água oxigenada, ao se mostrar eficaz, é uma alternativa de baixo custo e fácil acesso à população.

Resultados semelhantes foram encontrados em apenas um estudo, que testou a eficácia da mistura do ácido acético a 1% e do peróxido de hidrogênio a 3% na descontaminação de carne inoculada com *Escherichia coli*, *Listeria innocua* e *Salmonella wentworth*, que mostrou que a combinação dessas duas soluções resulta em maior redução de contagens microbianas quando comparado às mesmas soluções utilizadas de maneira isoladas (BELL; CUTTER; SUMNER, 1997). O presente estudo foi o primeiro passo para o surgimento de estudos futuros que avaliem essa mistura em diferentes formas experimentais, permitindo uma alternativa mais segura e barata que possa substituir os métodos caseiros de desinfecção atualmente utilizados. Além disso, é necessário avaliar a citotoxicidade da mistura em suas diferentes concentrações e sua eficácia em biofilmes complexos mais semelhantes ao que encontramos em próteses, uma vez que é uma mistura inovadora e os efeitos biológicos ainda são desconhecidos. A partir de estudos futuros será possível testar a mistura para a redução dos casos ou recidivas de estomatite protética que poderão ser avaliadas a partir de estudos clínicos *in vivo*. Em suma, os resultados desta pesquisa são de grande importância tanto para a prática clínica quanto para o uso doméstico de um método químico para desinfecção de próteses dentais.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a combinação do vinagre e água oxigenada em uma única mistura, independente da concentração, tem eficácia antimicrobiana, sendo tão eficaz quanto as formas comerciais do hipoclorito de sódio 0,5% e ácido peracético a 0,2%, contra os micro-organismos *C.albicans* ou *S.aureus* tanto para formação planctônica quanto para o biofilme específico formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica termopolimerizada.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução SS- 27**. Brasília, 2007. Disponível em: < http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/legislacao/SS-27-REP_280207.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec. Care Dentist.**, Chicago, v. 21, no. 1, p. 4-8, Jan. 2001.
- BELL, K. Y.; CUTTER, C. N.; SUMNER, S. S. Reduction of foodborne micro-organisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate, and hydrogen peroxide spray washes. **Food Microbiol.**, Nebraska, v. 14, no. 5, p. 439-448, Out. 1997.
- BRONDANI, M. A.; SAMIM, F.; FENG, H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. **Gerodontology**, Mount Desert, v. 29, no. 2, p. 6-15, Jun. 2012.
- CHASSOT, A. L.; POISL, M. I.; SAMUEL, S. M. In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 17, no. 2, p. 117-121, Maio 2006.
- ESTRELA, C. **Metodologia científica: ciência, ensino, pesquisa**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- FERNANDES, F. S. F. **Efeito do uso diário de um limpador químico enzimático sobre o biofilme de *Candida albicans* formado sobre materiais para base de próteses removíveis**. 2011. 37 f. Tese (Doutorado em Prótese Dental) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2011.
- FERREIRA, M. A. et al. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v. 13, no. 2, p. 237-242, Jun. 2009.
- HAHNEL, S. et al. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. **Gerodontology**, Mount Desert, v. 29, no. 2, p. 383-391, Jun. 2012.
- JAGGER, D. C. et al. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 15, no. 6, p. 549-552, Nov./Dez. 2002.
- KANNO, T. et al. Novel denture-cleaning system based on hydroxyl radical disinfection. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 25, no. 4, p. 376-380, Jul./Ago. 2012.
- LEAL, C. M. B. **Influência da rugosidade e energia livre de superfície de materiais para próteses removíveis a base de polimetilmetacrilato nas propriedades do biofilme de *Candida albicans***. 2011. 66 f. Tese. (Doutorado em Prótese Dental) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, 2011.
- MOURA, J. S. **Aderência de *Candida spp.* a resinas acrílicas: método de polimerização e presença ou não de saliva**. 2005. 54 f. Tese (Doutorado em Prótese Dental) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, 2005.

- NEPPELENBROEK, K. H. et al. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of Candida-related denture stomatitis. **J. Oral Rehabil.**, São Paulo, v.35, no. 11, p. 836-846, Nov. 2008.
- PINTO, T. M. et al. Vinegar as an antimicrobial agent for control of Candida spp. in complete denture wearers. **J. Appl. Oral Sci.**, São Paulo, v. 16, no. 6, p. 385-390, Dez. 2008.
- RIBEIRO, D. G. et al. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. **J. Dent.**, Kidlington, v. 37, no. 9, p. 666-672, Set. 2009.
- ROSSATO, M. B. et al. Analysis of the effectiveness of different hygiene procedures used in dental prostheses. **Oral Health Prev. Dent.**, New Malden, v. 9, no. 3, p. 221-227, Out. 2011.
- SANITA, P. V. et al. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 25, no. 3, p. 232-244, Maio/Jun. 2012.
- SENNA, P. M.; DA SILVA, W.J.; CURY, A. A. Denture disinfection by microwave energy: influence of Candida albicans biofilm. **Gerodontology**, Mount Desert, v. 29, no. 2, p. 186-191, Jun. 2012.
- 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.**, Philadelphia, v. 17, no. 8, p. 627-633, Dez. 2008.
- SILVA, M. M. et al. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, New York, v. 114, no.4, p. 469-479, Out. 2012.
- SILVA, S. M. **Estudo da cinética de decomposição de soluções de ácido peracético contaminadas com material orgânico.** 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Instituto Mauá de Tecnologia, Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, 2010.
- SILVA, W. J. **Influência da superfície de resinas de poli (metil metacrilato) na estrutura de biofilmes de Candida albicans.** 2009. 58 f. Tese (Doutorado em Prótese Dental) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, 2009.
- SKUPIEN, J. A. et al. Prevention and treatment of Candida colonization on denture liners: a systematic review. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 110, no. 5, p. 356-362, Nov. 2013.
- URBANIACK, G.C.; PLOUSE, S. **Research Randomizer.** Lancaster, 2013. Disponível em: <<http://www.randomizer.org>>. Acesso em: 14 jan. 2015.
- VIEIRA, A. P. et al. Long-term efficacy of denture cleansers in preventing Candida spp. biofilm recolonization on liner surface. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 24, no. 3, p. 342-328, Jul./Set. 2010.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado participante,

Estamos realizando um estudo de laboratório para estudarmos se diferentes soluções desinfetantes, tais como hipoclorito, água oxigenada e vinagre, são eficazes para eliminar alguns microorganismos orais. Para isso, iremos crescer estes microrganismos em laboratório, sobre um disco de "plástico", o mesmo utilizado para confeccionarmos as bases de dentaduras, chamado resina acrílica. Alguns microorganismos crescem melhor se tiverem contato com a saliva humana, seu ambiente natural. Assim, precisaremos de um voluntário que nos conceda saliva, para que possamos utilizar nos cultivos. Os procedimentos e detalhamentos estão descritos abaixo. Esse estudo será realizado por professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Durante a pesquisa, serão realizadas diversas coletas de saliva. No dia e período de cada coleta, você deverá comparecer ao Laboratório de Microbiologia (LABIM) da Faculdade de Odontologia. Um dos pesquisadores lhe dará uma goma inerte, semelhante a uma goma de mascar, porém sem sabor. Você deverá mastigá-la por 5 minutos para acelerar a produção de sua saliva. Durante esses 5 minutos, toda a saliva que você produzir será depositada dentro de um tubo plástico que será mantido em gelo. Essa saliva será tratada e utilizada no laboratório durante a pesquisa.

Os possíveis desconfortos associados à sua participação nessa pesquisa são aqueles apenas relacionados à mastigação prolongada da goma inerte durante a coleta de saliva. Durante os 5 minutos de mastigação, você poderá apresentar um cansaço

passageiro na musculatura do rosto, que desaparecerá nos minutos seguintes à coleta. Todas as medidas de biosegurança necessárias, tais como uso de materiais descartáveis, serão adotadas. O benefício associado à sua participação nessa pesquisa será um auxílio indireto, contribuindo para a realização desse projeto e para a Ciência como um todo.

A decisão de fazer parte dessa pesquisa é voluntária. Você poderá escolher se quer ou não participar, assim como poderá desistir de participar a qualquer momento. Fica ainda assegurado o direito ao sigilo de todas informações coletadas, não sendo permitido acesso por outra pessoa que não o próprio participante ou responsável. O material coletado será utilizado exclusivamente para fins desta pesquisa.

Toda e qualquer dúvida no decorrer do estudo poderá ser esclarecida pela **Profa. Dra. Cristiane Machado Mengatto** (Pesquisador-responsável por esta pesquisa) através do telefone (51) 99914176. Possíveis problemas podem ser reportados diretamente ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS 3308.3738.

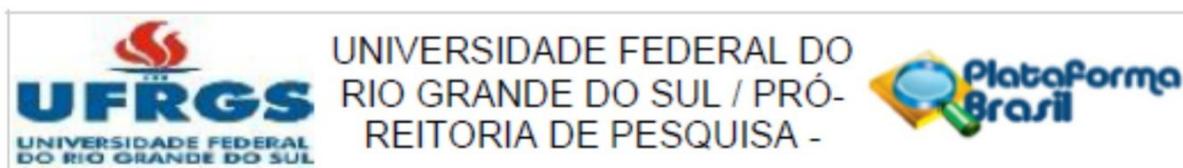
Eu, _____ (participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus direitos e dos deveres dos pesquisadores. Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo e aceito participar da pesquisa.

Porto Alegre, ____ de _____ de 201_.

Voluntário

Cristiane Machado Mengatto
(Pesquisador Responsável)

ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eficácia antimicrobiana do ácido peracético e da combinação de ácido acético e peróxido de hidrogênio como alternativa de método químico para a desinfecção de resina acrílica termopolimerizável - estudo in vitro

Pesquisador: Cristiane Machado Mengatto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32209614.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 714.626

Data da Relatoria: 26/06/2014

Apresentação do Projeto:

O crescimento do biofilme sobre a resina acrílica da prótese gera um desafio significativo para a eficácia da remoção microbiana e desinfecção. Diversos métodos de desinfecção foram testados e estão disponíveis no mercado. O ácido peracético é uma solução de amplo espectro antimicrobiano e que não produz subprodutos tóxicos, ao contrário do glutaraldeído. No entanto, há uma escassez de estudos avaliando a eficácia antimicrobiana do ácido peracético na desinfecção de próteses dentais. Assim, o objetivo geral deste estudo será avaliar a eficácia antimicrobiana do ácido peracético comercial e da combinação individual entre o peróxido de hidrogênio e o ácido acético na desinfecção de corpos de prova de resina acrílica. Para isso, serão confeccionados 120 corpos de prova padronizados, a partir de resina acrílica termopolimerizada por energia de microondas. Os espécimes serão inoculados com cepas comerciais de *Candida albicans* (n=60) e *Staphylococcus aureus* (n=60) em meio de cultura específico e serão submetidos de maneira randomizada aos diferentes agentes químicos de desinfecção: G1: água destilada estéril (controle); G2: hipoclorito de sódio comercial a 0,5% ; G3: ácido peracético comercial a 0,2%; G4: peróxido de hidrogênio comercial a 3%; G5: ácido acético comercial a 1% (vinagre); G6: solução manipulada de 100ml de peróxido de hidrogênio a 3% com 250ml de ácido acético a 1%. Cada grupo receberá a imersão de 10 corpos de prova de cada microorganismo inoculado, e a

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-080
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 714.626

eficácia da desinfecção será avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), por um examinador cego para o tipo da solução utilizada. Para avaliar o efeito da solução desinfetante sobre a rugosidade superficial da resina acrílica, a rugosidade será medida antes (t0) e após (t1) a

2

desinfecção. A contagem bacteriana após a desinfecção será comparada por meio da análise de variância (ANOVA), com teste de Tukey como post hoc, e alterações de rugosidade superficial serão analisadas através de ANOVA para medidas repetidas, com o nível de significância definido em p0,05.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia antimicrobiana do ácido peracético bem como da combinação do peróxido de hidrogênio e do ácido acético, na desinfecção da resina acrílica termopolimerizável inoculada com *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos de forma satisfatória.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo possui aprovação da Compesq Odontologia, embasa o objeto de estudo e mostra cronograma e orçamento adequados. Trata-se de um estudo in vitro que contará com a participação de um indivíduo para doação de saliva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Pela aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminha-se

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 714.626

PORTO ALEGRE, 10 de Julho de 2014

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br