



UNESP - Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araraquara



*Karen Tereza Altieri*

*Efetividade de duas soluções desinfetantes e da  
irradiação por micro-ondas na desinfecção de  
próteses totais contaminadas com *Staphylococcus  
aureus* resistente à meticilina (MRSA)*

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

ARARAQUARA

2011

**KAREN TEREZA ALTIERI**

**Efetividade de duas soluções desinfetantes e da irradiação  
por micro-ondas na desinfecção de próteses totais  
contaminadas com *Staphylococcus aureus* resistente à  
metecilina (MRSA)**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Machado

Prof. Dr. Wander José da Silva

Araraquara, 28 de março de 2011.

# Dados Curriculares

*Karen Fereza Altieri*

<b>NASCIMENTO</b>	21/09/1985 – São Paulo, São Paulo
<b>FILIAÇÃO</b>	Carlos Alberto Altieri  Regina Valentim de Souza Altieri
<b>2005 a 2008</b>	Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2007 a 2008</b>	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2009 a 2011</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2009 a 2010</b>	Estágio docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

# *Dedicatória*

Aos meus amados pais *Carlos* e *Regina*, por serem desde sempre meus alicerces. Obrigada por participarem de todas as etapas de minha vida, me proporcionando muita alegria. Obrigada também por me ensinarem a superar dificuldades sem desanimar e por me amarem e apoiarem incondicionalmente.

Ao meu maravilhoso irmão *Cacá*, por me ensinar tanto, mostrar o caminho correto em momentos difíceis e me proporcionar grandes alegrias.

A minha prima *Luciana*, que teve grande participação e importância em minhas escolhas profissionais. Obrigada pelo apoio.

*Dedico este trabalho*

# Agradecimentos

Ao meu orientador *Carlos Eduardo Vergani*, por ter paciência em me ensinar  
e mostrar que sou capaz de atingir meus objetivos.

As queridas professoras *Ana Lúcia, Ana Cláudia e Eunice*, pelo apoio,  
sugestões e ótima convivência.

Aos colegas de pós-graduação *Larissa, Giovana, Mariana Andrade,*  
*Mariana Basílio, Eduardo, Amanda Wady, Amanda Fontana, Diana,*  
*Juliana, Sabrina, Filipe, Patrícia, Cadu, Ana Paula, Carol, Cris e Lívia.*

Obrigada por me ajudarem e dividirem conhecimentos comigo.

Aos *Docentes* do programa de pós-graduação por acrescentarem muito a minha  
formação e conhecimentos profissionais.

As técnicas de laboratório *Sônia* e *Tati*, por me ajudarem na realização deste  
trabalho.

Aos *Funcionários* do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese pelo  
convívio agradável e apoio.

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –*  
*CAPES*, pela bolsa concedida durante o mestrado.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

# Agradecimentos especiais

A *Deus*, por me dar o dom da vida e estar sempre comigo em todos os momentos, me fazendo assim mais forte.

Aos meus pais *Carlos* e *Regina* e ao meu irmão *Cacá*, por serem simplesmente a melhor família do mundo.

As minhas amigas *Camila*, *Teresa*, *Livia*, *Juliana*, *Gláucia* e *Amanda*, por serem minha segunda família e tornar meus dias mais alegres. Obrigada pela amizade, cumplicidade, carinho e apoio.

Ao meu professor *Carlos Eduardo Vergani*, pela amizade e apoio em momentos tão difíceis de minha vida. Você me ajudou de forma inesperada e maravilhosa a superar obstáculos e conseguir realizar meu sonho. Muito obrigada por tudo.

A minha amiga *Paula*, por ter muita paciência e dedicação em me ajudar. Você foi peça fundamental na realização deste trabalho, me orientando em todos os momentos. Obrigada também por compartilhar grandes momentos comigo, tanto profissionais como pessoais.

A minha amiga *Camilinha*, que de pequeno só tem o tamanho. Obrigada por me ajudar em tudo e sempre que precisei, desde a graduação até o último momento de minha pós-graduação.

A minha amiga *Delise*, por estar sempre ao meu lado, disposta a ajudar e ouvir desabafos. Obrigada você por tornar meus dias mais alegres.

A *Stela*, técnica do laboratório de Microbiologia Aplicada, pelo apoio, dedicação e carinho prestados para a realização deste trabalho.

# Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	13
1 Introdução.....	16
2 Revisão da literatura.....	22
3 Proposição.....	87
4 Material e Método.....	89
4.1 Materiais.....	90
4.2 Instrumentos.....	92
4.3 Equipamentos.....	94
4.4 Métodos.....	96
4.5 Planejamento estatístico.....	119
5 Resultado.....	121
6 Discussão.....	126
7 Conclusão.....	137
8 Referências.....	139

*Resumo*

Altieri KT. Efetividade de duas soluções desinfetantes e da irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais contaminadas com *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## **Resumo**

Infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos são consideradas causa principal de mortalidade entre indivíduos imunocomprometidos e aproximadamente 50 % destas infecções tem sido relacionadas ao *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Estes microrganismos, quando presentes no biofilme das próteses dentárias, podem se dispersar nas secreções salivares e se disseminar pelo trato respiratório, causando pneumonia aspirativa. Assim, o presente estudo comparou a efetividade do hipoclorito de sódio a 1 %, digluconato de clorexidina a 2 % e irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais e corpos-de-prova circulares de resina acrílica para base de prótese (10 x 2 mm) contaminados com MRSA. Para isso, 36 próteses totais simuladas e 36 corpos-de-prova circulares foram confeccionados, esterilizados, inoculados com MRSA ( $10^7$  ufc/mL) e incubados a 37 °C (por 24 e 48 h, respectivamente). Após incubação, próteses totais e corpos-de-prova foram distribuídos em 4 grupos de estudo (n=9): GC - não foi realizado nenhum método de desinfecção; GH - foi realizada a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1 % por 10 min; GCI - foi realizada a imersão em solução de digluconato de clorexidina a 2 % por 10 min; GM - foi realizada a desinfecção por irradiação em forno de micro-ondas

a 650 W por 3 min. A efetividade dos procedimentos de desinfecção foi avaliada por meio de quantificação de colônias viáveis e da viabilidade celular. Para a quantificação de colônias viáveis, alíquotas de 25 µL da solução resultante das diluições seriadas ( $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  para GC e  $10^0$  a  $10^{-3}$  para os grupos experimentais) foram semeadas em placas de Petri em duplicata e todas as placas foram incubadas por 48 h a 37 °C. As colônias foram quantificadas em ufc/mL. Para verificar a efetividade da desinfecção por micro-ondas em longo prazo, as próteses totais desinfetadas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. A avaliação da viabilidade celular após os procedimentos de desinfecção foi realizada pelo método de redução do XTT. De acordo com os resultados, todas as próteses e corpos-de-prova dos grupos controles demonstraram crescimento microbiano. Não foi observado crescimento microbiológico em todas as próteses totais desinfetadas. Após 7 dias de incubação, houve crescimento microbiológico em todas as próteses desinfetadas por hipoclorito de sódio a 1 %. No ensaio de XTT, total inativação da viabilidade celular foi obtida para todos os corpos-de-prova desinfetados. A imersão em hipoclorito de sódio a 1 % demonstrou ser efetiva na desinfecção em curto prazo das próteses totais contaminadas por MRSA. A imersão em digluconato de clorexidina por 10 min e a irradiação por micro-ondas a 650 W por 3 min demonstraram desinfecção completa de todas as próteses totais e corpos-de-prova contaminados com MRSA. Com base no presente estudo, foi concluído que a desinfecção por irradiação por micro-ondas e por imersão em digluconato de clorexidina a 2% são eficientes na inativação de MRSA presente no biofilme de próteses.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; desinfecção; desinfetantes; micro-ondas; prótese total.

*Abstract*

Altieri KT. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## ***Abstract***

Infections caused by antibiotic-resistant bacteria have been recognized as a predominant risk factor for mortality in elderly patients and approximately 50 % of these infections have been related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). This microorganism, when present in the denture biofilm, can be released into the oral fluids and aspirated into the lower respiratory tract, thus causing infections such as aspiration pneumonia. The present study compared the efficacy of 1 % sodium hypochlorite, 2 % chlorhexidine gluconate, and microwave irradiation in disinfecting simulated complete dentures and circular specimens of acrylic resin denture base material (10 x 2 mm) contaminated with MRSA. Thirty-six dentures and 36 specimens were made, sterilized, inoculated with MRSA ( $10^7$  cfu/mL), and incubated at 37 °C (for 24 and 48 h, respectively). After incubation, dentures and specimens were divided into 4 groups of study (n=9): PC - positive control, consisting of dentures and specimens not disinfected; HY - soaking in 1 % sodium hypochlorite solution for 10 min; CHL - soaking in 2 % chlorhexidine gluconate solution for 10 min; and MW - irradiating by microwave for 3 min at 650W. The effectiveness of the disinfection procedures was assessed cell viability

(quantification of viable cells and XTT reduction method). For quantification procedures, aliquots of suspensions were plated at dilutions ( $10^{-3}$  to  $10^{-6}$  for PC and  $10^0$  to  $10^{-3}$  for experimental groups) and incubated (37 °C/48 h). Colonies counts (cfu/mL) were quantified. Dentures disinfected were also incubated at 37 °C for 7 days to verify the long-term effectiveness of disinfection. The viability of cells in each group of specimens was evaluated by XTT reduction method. The results showed that all dentures and specimens from the PC groups showed substantial microbial growth. No evidence of microbial growth was observed on plates of all disinfected dentures. After 7 days incubation, broth turbidity was observed in all beakers containing the dentures disinfected by 1 % sodium hypochlorite. In XTT assay, no evidence of microbial growth was observed in all disinfected circular specimens. It was concluded that soaking in 1 % sodium hypochlorite solution was effective for a short-term disinfection of dentures contaminated with MRSA. Soaking in 2 % chlorhexidine gluconate solution for 10 min and microwave irradiation for 3 min at 650 W showed complete disinfection of all dentures and circular specimens contaminated with MRSA. From the present investigation, it can be concluded that microwave irradiation and 2 % chlorhexidine gluconate are effective in inactivating MRSA present in denture biofilms.

**Key Words:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; disinfection; disinfectants; microwaves; denture, complete.

*Introdução*

# 1 Introdução

O microrganismo *Staphylococcus aureus* é considerado um dos patógenos humanos de maior patogenicidade, principalmente por apresentar capacidade de desenvolver resistência às terapias medicamentosas<sup>25,52,80</sup>. Algumas cepas de *S. aureus*, devido a alterações em sua parede celular relacionadas à ativação e ao aumento de síntese de alguns componentes, desenvolveram resistência a vários agentes antibacterianos, tendo sido denominadas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA)<sup>48</sup>. Embora o mecanismo pelo qual as cepas de MRSA tornam-se resistentes aos antibióticos não ser completamente compreendido, o mecanismo mais comum está relacionado à presença de uma proteína adquirida chamada PBP2a, que é codificada pelo gene de resistência à meticilina (*mecA*) e menos afetada pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos<sup>62</sup>. Tem sido relatado na literatura que o MRSA tem sido frequentemente identificado entre isolados clínicos de *S. aureus* em indivíduos idosos ou imunocomprometidos<sup>25,50,52,121</sup>, resultando no aparecimento de sérias infecções sistêmicas, especialmente nestes pacientes<sup>50,92</sup>. Ainda, estudos têm demonstrado elevadas taxas de mortalidade após infecções por MRSA<sup>3,30,40,56</sup>, sendo que aproximadamente 52 % das infecções hospitalares em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) são causadas por esse microrganismo<sup>71</sup>. Dentre as infecções sistêmicas relacionadas ao *S. aureus*, a pneumonia aspirativa tem sido considerada uma das mais preocupantes<sup>122</sup>, devido à elevada taxa de mortalidade entre pacientes idosos<sup>46,70,72,76,91</sup>. Estudos ainda demonstraram que as infecções de pneumonia aspirativa de evolução mais severa e virulenta estão relacionadas à presença do MRSA<sup>70,117</sup>.

O ambiente orofaríngeo apresenta uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus<sup>65</sup>. Dentre esses microrganismos, cepas de MRSA têm sido isoladas de amostras de saliva e da cavidade oral<sup>39,52,110</sup>. A associação entre a colonização do meio bucal por este microrganismo e a presença de próteses dentárias faz com que os usuários de próteses se tornem ainda mais suscetíveis às infecções por MRSA<sup>52,97,121,123</sup>. Vários estudos relataram a contaminação da superfície das próteses dentárias por cepas de MRSA<sup>52,97,110,121</sup>. O biofilme aderido às próteses é um reservatório de patógenos<sup>1,45,99,101</sup> que pode se desprender da superfície protética, se dispersar nas secreções salivares, sendo aspirado e disseminado para outros locais do corpo<sup>43,58,110</sup>, causando, assim, infecções como a pneumonia aspirativa<sup>116</sup>. A aspiração das bactérias da orofaringe tem sido identificada como a mais importante rota de infecção no desenvolvimento de pneumonia aspirativa<sup>12,126</sup>. Sumi et al.<sup>116</sup>, em 2002, identificaram uma elevada prevalência de patógenos respiratórios na superfície das próteses dentárias, sugerindo que uma higiene inadequada destas próteses pode estar relacionada ao desenvolvimento de pneumonia bacteriana. A presença de biofilme sobre as próteses pode também causar a colonização nasofaríngea persistente<sup>63,97</sup>, levando ao aparecimento de infecções recorrentes<sup>109</sup> e de resistência microbiana<sup>22,26,49,87,127</sup>. Um estudo demonstrou que a incidência de pneumonia e morte diminuiu significativamente nos pacientes incluídos em um programa intensivo de saúde bucal<sup>133</sup>, sugerindo que cuidados bucais prévios podem ser mais efetivos na prevenção da mortalidade do que o próprio tratamento medicamentoso da pneumonia<sup>133</sup>. Assim, tem sido sugerido que uma adequada higiene da cavidade oral e desinfecção das próteses dentárias devem ser cuidadosamente realizadas

para se evitar a disseminação ou recorrência das infecções locais e sistêmicas relacionadas ao MRSA. Esses cuidados são ainda mais críticos em pacientes com dificuldades de acesso aos cuidados profissionais, em especial idosos dependentes, hospitalizados ou institucionalizados e pacientes com necessidades especiais, que geralmente apresentam condições de higiene bucal extremamente deficientes<sup>89</sup> e saúde oral bastante debilitada<sup>19,102</sup>. Nessas condições, a colonização por *Staphylococcus* spp. e MRSA<sup>8,19,35</sup> é ainda mais favorecida. Apesar dos aspectos mencionados, a influência de uma adequada qualidade de saúde bucal sobre a saúde sistêmica e o risco de infecções por MRSA são frequentemente ignorados<sup>33,85,89</sup>.

Considerando o potencial elevado do MRSA em produzir infecções invasivas, particularmente em pacientes debilitados, medicamentos tópicos e sistêmicos têm sido utilizados para a sua erradicação<sup>22,26,37,49,55,64,69,81,87,94,108-109,118,127-128</sup>. Entretanto, tem sido verificado o desenvolvimento de resistência das cepas de MRSA a estes agentes antimicrobianos<sup>26,87</sup>. Além disso, independentemente da eficácia, essas medicações erradicam o microrganismo sistemicamente, sem, contudo, reduzir sua colonização nas próteses dentárias, favorecendo a recolonização dos tecidos e a recorrência das infecções. Devido à dificuldade do tratamento das infecções relacionadas ao MRSA, a prevenção tem sido considerada como a melhor terapia<sup>25</sup>. Neste contexto, a erradicação do MRSA de biofilmes de próteses removíveis, parciais ou totais, deve ser obtida para adequado controle de infecções relacionadas a esse microrganismo. Dentre os métodos de desinfecção de próteses disponíveis atualmente, a utilização de soluções químicas, como o hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina, dióxido de

cloro, iodóforo e álcool, tem sido recomendada<sup>18,20,27,51,61,67,98</sup>. Soluções de hipoclorito de sódio têm ação bactericida e fungicida<sup>2,21</sup>, mostrando-se eficientes na eliminação de placa bacteriana, de manchas e na inibição da formação de cálculo. Um recente estudo demonstrou que o hipoclorito de sódio na concentração de 2 % foi efetivo na eliminação de biofilme de MRSA após 1 min de exposição<sup>60</sup>. Entretanto, a utilização de hipoclorito de sódio em determinadas concentrações, apesar de efetiva para desinfecção, vem sendo limitada devido aos seus possíveis efeitos deletérios, como alterações de cor das bases acrílicas<sup>114</sup>. O digluconato de clorexidina também possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana, devido a sua interação com a membrana citoplasmática dos microrganismos, comprometendo seus componentes intracelulares<sup>41</sup>. DeBaun<sup>34</sup>, em 2008, realizou um estudo avaliando as propriedades antimicrobianas do digluconato de clorexidina e concluiu que esta solução é um agente antimicrobiano efetivo na erradicação de MRSA. Entretanto, nesse estudo os testes foram realizados com células na condição planctônica. Quando da análise da ação antimicrobiana da clorexidina em biofilme, Smith, Hunter<sup>113</sup> verificaram que esse agente não inativou completamente as células de MRSA, observando um índice de sobrevivência de 11 %.

Além dos métodos químicos de desinfecção, a utilização de métodos físicos tem sido recomendada para a inativação de biofilme de próteses dentárias. No estudo de Rossi et al.<sup>97</sup>, desinfecção térmica (100 °C por 10 h) foi necessária para a eliminação de MRSA de próteses dentárias de pacientes que apresentavam colonização orofaríngea persistente. Da mesma forma, estudos *in vitro*<sup>38,68,74,100,105</sup> têm demonstrado que a irradiação por micro-ondas é um método físico efetivo e seguro na inativação de vários microrganismos, incluindo

*S. aureus* sensível à metilina (MSSA). Além disso, um estudo clínico recente demonstrou que biofilmes de próteses totais, contendo *S. aureus*, foram inativados por meio de irradiação das próteses por micro-ondas durante 3 min a 650 W<sup>93</sup>. Apesar de este método físico de desinfecção já ter sido previamente avaliado na erradicação de outros microrganismos<sup>9,36,68,73-74,95,100,105,130,131</sup>, sua efetividade na eliminação de MRSA ainda não foi verificada. Dessa forma, outros estudos são necessários com o objetivo de avaliar a efetividade deste método de desinfecção na erradicação de MRSA presente em biofilme de próteses.

*Revisão da literatura*

## 2 Revisão da literatura

Em 1965, Olsen<sup>78</sup> investigou a utilização da energia de micro-ondas sobre os microrganismos *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. e *Rhizopus nigricans*, principais responsáveis pela proliferação fúngica em pães. Os esporos destes microrganismos foram cultivados em tubos contendo Agar Batata Dextrose e incubados por 7 dias. Os esporos obtidos por meio dessa cultura foram ressuspensos em 10 mL de água destilada contendo 0,01 % de lauril sulfato de sódio, sob agitação. Alíquotas dessas suspensões foram inoculadas em fatias de pães produzidos com ou sem a incorporação de conservante. As fatias de pães foram irradiadas por 2 min em um forno de micro-ondas não convencional a uma potência de 5.000 W. Após a irradiação, a região dos pães inoculada com os microrganismos foi retirada, macerada e inserida em um recipiente contendo 50 mL de água destilada. Em seguida, o recipiente foi agitado por 10 min, alíquotas da solução resultante foram semeadas em placas de Petri e o número de colônias foi contado. O número de colônias e de esporos viáveis foi comparado com amostras de pães não irradiados, mas que foram submetidos à mesma temperatura atingida pela irradiação. Foi observado que os números de esporos viáveis e de colônias dos três fungos avaliados foram significativamente reduzidos após a irradiação em micro-ondas. Segundo o autor, a literatura tem demonstrado que as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são inativadas em temperaturas entre 54,11 °C a 56,88 °C quando mantidas por 20 min. No entanto, a maior temperatura registrada no forno de micro-ondas utilizado nesse estudo foi de 51,33 °C. Considerando o tempo de exposição utilizado (2 min) e a incapacidade das amostras de pães utilizadas em manterem

a temperatura atingida por tempo maior do que 5 a 10 min, o autor sugeriu que a redução no número de esporos após a irradiação por micro-ondas não foi, provavelmente, originada de um efeito térmico convencional. Além disso, as soluções salinas presentes no citoplasma dos esporos poderiam representar um alvo preferencial para a energia de micro-ondas, o que elevaria a temperatura interna desses microrganismos, promovendo sua lise ou inativação.

O objetivo do estudo de Carrol, Lopez<sup>24</sup>, em 1969, foi avaliar a possibilidade de um efeito não-térmico das micro-ondas na inativação dos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyce cerevisiae*. Para isso, foi utilizado um aparelho de micro-ondas não convencional com potência de 500 W. Inicialmente, foi avaliado o efeito do pH sobre os microrganismos, por meio de sua imersão em diferentes soluções com pH específicos (leite, suco de tomate e suco de laranja). Para o cultivo nas placas de Petri, os microrganismos foram previamente inoculados nos alimentos citados e irradiados a 500 W, por períodos entre 16 e 64 min. Os autores observaram que não houve redução significativa no número dos microrganismos testados nas soluções com diferentes valores de pH. Após a irradiação por micro-ondas, não foi observada redução de *S. cerevisiae* e *E. coli*, previamente inoculados no leite e no suco de tomate. No entanto, para o suco de laranja, ocorreu uma redução progressiva do número de microrganismos com o aumento do tempo de exposição às micro-ondas. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a composição química da suspensão irradiada e a das células microbianas podem explicar os efeitos não térmicos provenientes das micro-ondas. Além disso, os autores relataram que existe a possibilidade de ocorrer a lise celular de um microrganismo devido à rápida oscilação das cargas celulares

elétricas negativas em decorrência de interação com o campo eletromagnético das micro-ondas. Essa oscilação, segundo os autores, pode exceder os limites elásticos da estrutura celular, promovendo seu rompimento. Foi também enfatizado que, como a energia das micro-ondas é absorvida seletivamente por certas moléculas constituintes de uma célula microbiana, tais como o DNA ou alguma proteína essencial, poderia ocorrer uma desnaturação irreversível dessas estruturas e os microrganismos serem inativados mesmo em níveis baixos de calor.

Bassiouny et al.<sup>14</sup>, em 1975, realizaram um estudo avaliando o efeito da escovação com gel contendo digluconato de clorexidina a 1 % na redução do índice de placa, índice de inflamação gengival, índice de cálculo e na profundidade de sondagem de bolsas periodontais. Foram selecionados 49 pacientes portadores de próteses removíveis. Os participantes foram divididos em 2 grupos: GA) realizaram escovação com gel contendo digluconato de clorexidina a 1 % nas primeiras 6 semanas e escovação com gel placebo nas 6 semanas seguintes e GB) realizaram escovação com gel placebo nas primeiras 6 semanas, e nas semanas seguintes realizaram escovação com gel de clorexidina. Os pacientes foram avaliados antes, durante e após a finalização do experimento. Os resultados mostraram que, em relação ao índice de placa bacteriana e ao índice de inflamação gengival, houve uma redução estatística significativa com o uso do gel contendo clorexidina quando comparado ao grupo placebo. Entretanto, em relação ao índice de cálculo e profundidade de sondagem não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Ao final do estudo, alguns pacientes relataram reações adversas e manchamentos nos dentes com o uso da clorexidina. Os autores concluíram que o uso da clorexidina

foi efetivo na prevenção da formação de placa bacteriana e como agente terapêutico no tratamento da gengivite.

Backenstose, Wells<sup>7</sup>, em 1977, realizaram um estudo in vitro com o objetivo de avaliar o efeito corrosivo de diferentes agentes de limpeza sobre as estruturas metálicas. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova com três diferentes metais utilizados na confecção de próteses: níquel-cromo, alumínio e aço inoxidável. Os corpos-de-prova foram imersos em diferentes soluções: Polident e Efferdent (compostos por peróxido alcalino); Mersene, Clorox e Calgon-Clorox (compostos por hipoclorito de sódio); Vinagre e água destilada pelo tempo total de 240 h. De acordo com os resultados, 240 h de imersão em Polident, Efferdent e água destilada não causaram descoloração e efeitos corrosivos aos metais. No entanto, mudanças foram observadas no níquel-cromo após 8 h de imersão em Clorox e no alumínio após imersão de 8 h em Mersene e Clorox. As mudanças nos metais foram se intensificando no decorrer das 240 h de imersão, resultando em severos manchamentos nas amostras expostas ao Clorox e efeito corrosivo as amostras imersas em Mersene. Após 64 h de imersão em Calgon-Clorox, as amostras apresentaram características semelhantes das encontradas nas amostras expostas ao Mersene. Os autores concluíram que as soluções que apresentaram hipoclorito de sódio em sua composição (Clorox, Mersene e Calgon-Clorox) não podem ser utilizadas para higienização de próteses com metal, pois esta solução pode causar danos às estruturas metálicas.

No estudo de Bay<sup>16</sup>, em 1978, o efeito da escovação com diferentes concentrações de clorexidina na prevenção do desenvolvimento de placa bacteriana e inflamação gengival foi avaliado. Além disso, foi verificada a

correlação da intensidade de manchamento nos dentes com diferentes concentrações de solução de digluconato de clorexidina. Para isso, 15 estudantes com idade entre 20 e 24 anos participaram do estudo. O estudo teve duração de 180 dias e foi realizado em três períodos experimentais, com 60 dias para cada período. Os participantes foram divididos aleatoriamente entre 4 grupos: G1: escovação com digluconato de clorexidina a 0,15 %; G2: escovação com digluconato de clorexidina a 0,10 %; G3: escovação com digluconato de clorexidina a 0,05 %; e G4: escovação com solução placebo (grupo controle). Os participantes realizaram a escovação duas vezes ao dia, sendo que, em cada escovação, as escovas de dente foram imersas nas diferentes soluções 8 vezes. A intensidade da cor dos dentes, o índice de placa bacteriana e inflamação gengival foram avaliados clinicamente e através de fotografias tiradas no início, após 14, 30, 45 dias e no final de cada período de 60 dias. Os resultados mostraram que na avaliação após 45 dias, uma redução nos índices de placa e inflamação gengival foi observada para os grupos que realizaram a escovação com clorexidina quando em comparação ao inicial e ao dia 14. No final do experimento, não houve diferença estatística significativa entre os valores de índices de placa bacteriana e inflamação gengival para os grupos G1 e G2. Para o grupo G3, os índices de placa bacteriana e inflamação gengival foram superiores quando comparados aos grupos G1 e G2. No final do experimento, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram uma redução de 72 %, 66 % e 43 %, respectivamente, no índice de placa bacteriana quando em comparação ao grupo controle, e de 57 %, 47 % e 10 %, respectivamente, quando comparados aos índices de placa bacteriana aos 14 dias. Os valores médios de redução na inflamação gengival para os grupos G1, G2 e G3 foram 58 %, 57 % e 43 %, respectivamente.

respectivamente, em relação ao grupo controle e 36 %, 34 % e 12 % em relação ao obtido aos 14 dias de experimento. As fotografias mostraram que a utilização de clorexidina nas concentrações de 0,15 %, 0,10 % e 0,05 % causaram manchamento nos dentes e a intensidade das manchas foi diretamente correlacionada com a concentração da solução. Com estes resultados, os autores concluíram que o uso da solução de digluconato de clorexidina nas concentrações de 0,15 % e 0,10 % foi mais efetivo na redução do índice de placa bacteriana e inflamação gengival.

A efetividade da esterilização de microrganismos patogênicos por meio da irradiação por micro-ondas foi avaliada por Fitzpatrick et al.<sup>44</sup>, em 1978. Para os experimentos foram utilizados tubos de ensaio com suspensão salina de *S. aureus*, esporos a seco de *B. subtilis* ou tiras umedecidas com esporos de *B. subtilis*. Inicialmente, cada condição avaliada foi submetida a cinco irradiações sucessivas por 12 s a 1000 W. Esses experimentos demonstraram que o tratamento, apesar de ter sido efetivo para eliminar formas metabólicas (*S. aureus*), foi insuficiente para inativar as formas esporuladas. A partir desses resultados, os autores realizaram experimentos com tiras contaminadas com esporos (*Bacillus stearothermophilus* e *B. subtilis*) e umedecidas em água destilada. Em seguida, essas tiras foram irradiadas por períodos superiores a 15 e 30 min. No entanto, ainda foi observada cultura positiva para os esporos testados. Com base nessas observações, culturas desses esporos foram incubadas em outros tubos de ensaio abertos. Entretanto, experimentos demonstraram crescimento em todas as culturas avaliadas. Devido a essas observações, os autores realizaram experimentos com tubos de ensaio vedados com roscas e verificaram que não houve crescimento nas culturas avaliadas pelo

período de 7 dias. Foi concluído que a esterilização satisfatória por meio da irradiação em micro-ondas apresentou-se viável quando o conteúdo a ser irradiado foi adequadamente selado. Além disso, os autores sugeriram que a esterilização ocorrida foi devido a um efeito puramente térmico.

Em 1979, Budtz-Jørgensen<sup>21</sup> realizou uma revisão de literatura discutindo os melhores materiais e métodos para a limpeza de próteses removíveis. O autor avaliou os métodos: mecânicos (escovação e agitação ultra-sônica) e químicos (peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos e agentes desinfetantes). De acordo com o autor, a higienização mecânica pode ser realizada com água, agente desinfetante ou dentífrico. Tem sido relatado que esta técnica, quando realizada corretamente, remove o biofilme presente nas próteses. Entretanto, o uso do dentífrico pode causar desgastes na resina acrílica devido às partículas abrasivas presentes nesses produtos. Segundo o autor, a agitação ultra-sônica não é um método eficiente para a remoção do biofilme. Outra opção para a limpeza de próteses são os métodos químicos, onde as próteses ficam imersas por um determinado período em diferentes soluções, podendo ser: peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos orgânicos ou inorgânicos, soluções desinfetantes, entre outras. O autor explicou que os peróxidos alcalinos tornam-se soluções de peróxidos de hidrogênio quando dissolvidos em água. Estes produtos apresentam uma combinação de detergentes alcalinos para reduzir a tensão superficial, e agentes, como perborato de sódio ou percarbonato, que liberam oxigênio na solução. Estas bolhas de oxigênio são responsáveis por exercer a limpeza mecânica das próteses. Ainda, segundo o autor, a imersão prolongada das próteses neste produto não causa alterações na superfície da resina acrílica. As soluções de

hipocloritos alcalinos são outras opções para a higienização das próteses, pois as mesmas apresentam ação bactericida e fungicida. Porém, não podem ser utilizadas em próteses com presença de metal, pois apresentam efeito corrosivo. Já nas próteses sem a presença de metal, o autor relatou que as soluções de hipocloritos alcalinos podem causar descoloração da resina acrílica e, por isso, o autor sugeriu o uso destas soluções apenas uma vez por semana. As soluções que apresentam ácidos em suas composições possuem efeito contra cálculos e manchas presentes na resina das próteses. Porém, também causam corrosão ao metal, não sendo, assim, muito utilizadas. As soluções desinfetantes, como a solução de digluconato de clorexidina, apresentam redução significativa do biofilme presente nas próteses. Entretanto, o autor relata que essas soluções também podem ser inadequadas para a imersão diária das próteses, pois causam alteração de cor na resina acrílica. O autor também sugere que os métodos de imersão podem ser uma alternativa importante para pacientes idosos ou que apresentam algum tipo de deficiência.

Roher, Bulard<sup>95</sup>, em 1985, realizaram um estudo para avaliar a efetividade das micro-ondas na redução da infecção cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese. Os autores realizaram as experiências com os microrganismos inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura, próteses com metal ou totalmente em resina acrílica, brocas metálicas e peças de mão. Os corpos-de-prova foram contaminados com  $10^5$  ufc/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) de cada um dos seguintes microrganismos: três tipos de bactérias não esporuladas (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella pneumoniae*), uma bactéria aeróbica esporulada (*B. subtilis*), uma bactéria esporulada anaeróbica (*Clostridium*

*histolyticum*), um fungo (*Candida albicans*) e dois vírus (polio tipo 1 e herpes simplex tipo 1). Para as irradiações no forno de micro-ondas, os corpos-de-prova foram ou não fixados a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores. Os corpos-de-prova contaminados foram submetidos às micro-ondas a uma potência de 720 W, nos tempos experimentais de 0, 1, 3, 5, 8 e 10 min, e incubados a 37 °C. A bactéria *B. subtilis* foi também inoculada em tiras de papel irradiadas por 20 min. O crescimento dos microrganismos foi avaliado para todos os materiais após 24 e 48 h pela análise da turvação do meio e crescimento de colônias em placas de Petri. Para a irradiação das próteses, duas condições foram avaliadas para os testes de estabilidade dimensional: as próteses foram mantidas por 15 min em água ou foram mantidas a seco, antes de serem irradiadas. Segundo os autores, os resultados obtidos quando o dispositivo rotacional tridimensional foi utilizado evidenciaram maior efetividade no tratamento com micro-ondas. Os tubos de ensaio contaminados com a mistura de quatro bactérias aeróbicas e *C. albicans* não demonstraram crescimento após 10 min de irradiação. A esterilização da bactéria esporulada anaeróbica *C. histolyticum* ocorreu após 3 min de irradiação. As tiras de papel com a bactéria esporulada aeróbica *B. subtilis* demonstraram esterilização apenas após 15 min de irradiação. As brocas dentárias, quando imersas em suspensão de quatro bactérias aeróbicas e expostas às micro-ondas por 10 min, apresentaram esterilização. As peças de mão contaminadas com a mesma suspensão bacteriana foram esterilizadas após 10 min de irradiação. As próteses contaminadas com as suspensões individuais de quatro bactérias aeróbicas e do fungo apresentaram esterilização para todos os microrganismos testados após 8 min de exposição às micro-ondas. Quando uma mistura de suspensões desses

microrganismos foi utilizada, a esterilização das próteses foi observada após 10 min de irradiação. Não foram observadas alterações dimensionais, tanto para as próteses imersas previamente em água quanto para as mantidas a seco e expostas às micro-ondas por até 16 min. Para uma esterilização efetiva de materiais odontológicos, os autores sugeriram a irradiação por micro-ondas associada à utilização do dispositivo tridimensional desenvolvido nesse estudo.

Com o objetivo de minimizar a infecção cruzada entre o consultório odontológico e o laboratório de prótese, Henderson et al.<sup>51</sup>, em 1987, avaliaram a efetividade de um protocolo experimental (barrier system) para desinfecção de próteses. Para realização do protocolo, inicialmente uma cultura de próteses de pacientes foi obtida por meio de coleta com “swab oral”. Em seguida, as próteses foram escovadas com uma solução de clorexidina a 4 % por 1 min, secas com jatos de ar, imersas em uma das soluções desinfetantes avaliadas (glutaraldeído a 2 %, glutaraldeído diluída ou hipoclorito de sódio a 5,25 %) e, individualmente, submetidas ao ultra-som por 10 min. Para avaliação da efetividade do protocolo, uma nova cultura foi obtida após a imersão em solução desinfetante. Os resultados evidenciaram culturas positivas para todas as próteses avaliadas. Porém, menores números de culturas foram observados com a utilização das soluções de glutaraldeído concentradas e de hipoclorito de sódio em relação à de glutaraldeído diluída. Os autores recomendaram a utilização do protocolo desenvolvido, que foi considerado efetivo no controle de infecção cruzada.

Em 1989, Bell et al.<sup>18</sup> compararam a eficácia biocida do dióxido de cloro e hipoclorito de sódio a 5,25 % (diluição 1:10) em tiras de resina acrílica inoculadas com *S. aureus*, *C. albicans* ou *E. coli* na presença de uma matéria

orgânica. Tiras de resina acrílica estéreis foram imersas em  $10^5$  -  $10^7$  ufc/mL de solução de cada microrganismo. Em seguida, as tiras foram desinfetadas em dióxido de cloro, hipoclorito de sódio ou solução salina estéril, por 30 s, 1, 2 ou 4 min. Após a desinfecção, as tiras foram neutralizadas e incubadas por 72 h. Os resultados demonstraram uma diferença entre a capacidade do dióxido de cloro e do hipoclorito de sódio para erradicar os organismos testados em tiras de resina acrílica quando a matéria orgânica está presente. O dióxido de cloro resultou em desinfecção completa de todos os microrganismos em 2 min. O hipoclorito de sódio resultou em desinfecção completa de todos os microrganismos após 4 min de imersão.

Para prevenir a propagação de MRSA entre consultórios odontológicos, é importante erradicá-lo primeiramente nos pacientes, que são os responsáveis pelo transporte deste microrganismo. Assim, Honma et al.<sup>52</sup>, em 1994, realizaram um estudo para detectar a presença de MRSA e *S. epidermidis* resistente à metilina (MRSE) em saliva humana e em superfícies de próteses dentárias. Foram obtidas 166 amostras de saliva, sendo 127 de estudantes de odontologia e 39 de indivíduos usuários de próteses totais ou parciais. Além disso, também foram submetidas à avaliação 39 amostras de swab com esfregaço das superfícies das próteses. Dois meios seletivos foram usados para a detecção de espécies de *Staphylococcus* (*Staphylococcus* nº 110 e Phenol Red Broth suplementado com manitol, oxacilina e polimixina B). Um swab esterilizado foi imerso em cada amostra de saliva por alguns segundos e então semeado em cada meio seletivo. Para obter o material da superfície da prótese, um swab estéril foi esfregado firmemente por toda a superfície da prótese, semeado nos 2 meios seletivos e incubado a 37 °C de 5 a 7 dias. Para identificar

cada isolado, foi utilizada a coloração gram, identificação de características morfológicas, testes bioquímicos, como a produção de ácido a partir do manitol, e liquefação de gelatina. A porcentagem de MRSA e MRSE nas amostras de saliva dos estudantes de odontologia foi de 3,1 %, e nas amostras de swab com a raspagem das superfícies protéticas foi 12,8 %. A porcentagem detectada de *S. aureus* ou *S. epidermidis* nas amostras de swab foi 53,8 %. A fim de avaliar a suscetibilidade dos isolados aos antibióticos, os autores espalharam uniformemente uma alíquota de 100 µL de cada suspensão celular em placas com Trypticase Soy Agar (TSA). Em seguida, um disco de antibiótico foi colocado na placa inoculada. Após incubação por 4 h, a inibição do crescimento foi medida e a concentração inibitória mínima (CIM) determinada. Os experimentos demonstraram que todos os isolados foram resistentes ou pouco sensíveis à penicilina, cefalexina, kanendomicina e polimixina B. A maioria dos isolados foram sensíveis à minociclina e tetraciclina. Inesperadamente, 3 isolados foram resistentes à vancomicina. Com base nos resultados, a detecção de MRSA e MRSE em amostras de saliva e amostras de próteses indicou que uma rigorosa desinfecção e esterilização são essenciais para evitar a propagação desses microrganismos em consultórios odontológicos. Com base nos resultados, os autores sugerem a desinfecção diária das próteses dentais como meio de eliminar esses microrganismos, destacando a importância desses cuidados para idosos com saúde comprometida e, portanto, mais suscetíveis às infecções.

Rosaspina et al.<sup>96</sup>, em 1994, avaliaram o efeito da irradiação por micro-ondas em instrumentos cirúrgicos contaminados com *C. albicans*. Lâminas de bisturis e lamínulas de microscopia foram contaminadas com *C. albicans* a

uma concentração de  $10^7$  ufc/mL. Após terem sido secas, as amostras foram completamente imersas em recipiente de vidro com esferas de vidro de 0,4 cm e água destilada. Esse recipiente foi, então, exposto à irradiação por micro-ondas a 600 W a uma frequência de 2.400 MHz. O tempo de exposição variou de acordo com a temperatura alcançada pelo banho. Assim, os seguintes tempos foram utilizados: 1,5 min (45 °C), 3 min (55 °C) e 6 min (100 °C). Preparações similares foram realizadas para o grupo controle utilizando-se estufa (2 h, 140 °C) ou autoclave (20 min, 121 °C), enquanto que outras preparações foram submersas em água em ebulição pelos mesmos tempos de exposição das micro-ondas. Algumas amostras foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para verificar a esterilização, as amostras foram colocadas em contato com placas de TSA e incubadas a 37 °C por 48 h. Os resultados demonstraram que todas as amostras (50 lâminas de bisturi e 25 lamínulas de microscopia) foram completamente esterilizadas após exposição por 2 min às micro-ondas. As análises em MEV revelaram que as alterações nas leveduras irradiadas foram proporcionais ao tempo de exposição. As amostras imersas em água em ebulição por 9 min apresentaram mortalidade de 100 %, porém nenhuma modificação na morfologia celular foi evidenciada. As alterações morfológicas observadas após a irradiação por micro-ondas foram completamente diferentes das observadas após o tratamento em água em ebulição. Assim, os autores concluíram que, além do incontestável efeito térmico, as micro-ondas podem exercer também um efeito mais complexo no corpo celular dos microrganismos.

Atmaca et al.<sup>5</sup>, em 1996, avaliaram o efeito da irradiação por micro-ondas e da aplicação de calor convencional sobre a reprodução de

bactérias. Cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas acidovorans* foram cultivadas em suspensão e o número de ufc/mL de cada espécie foi determinado e utilizado como controle. Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão bacteriana foi irradiada por micro-ondas a 550 W durante 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 e 30 s. Em seguida, cada suspensão foi diluída e cultivada em placas a 37 °C por 24 h. O valor de ufc/mL foi, então, determinado. Antes e após a irradiação, a temperatura da suspensão bacteriana foi determinada por meio de um termômetro digital. O experimento foi realizado 5 vezes para cada espécie bacteriana e para cada tempo de exposição. Também foram realizados ensaios com aplicação de calor convencional durante 16, 20, 25 e 30 s, tempos em que a contagem de bactéria foi reduzida significativamente. Suspensões de 5 mL de cada espécie bacteriana também foram irradiadas durante 14, 16, 18, 20, 25 e 30 s. Os resultados demonstraram que a redução na contagem de bactérias após a irradiação por micro-ondas foi estatisticamente significativa em relação ao controle. A diminuição na contagem de bactérias expostas ao calor convencional foi significativa em relação às amostras irradiadas por micro-ondas. Porém, inversamente ao observado com as amostras irradiadas, a aplicação de calor convencional por 30 s resultou em sobrevivência bacteriana. O aumento do volume das suspensões potencializou o efeito destrutivo das micro-ondas, uma vez que, após a irradiação, a contagem das suspensões de 5 mL foi significativamente menor que a das suspensões de 1 mL. Os autores concluíram que o efeito da irradiação por micro-ondas na inativação de bactérias é diferente do efeito térmico e que o conteúdo de líquido no meio desempenha uma função importante na absorção da energia decorrente da irradiação por micro-ondas.

O objetivo do estudo de Rossi et al.<sup>97</sup>, em 1996, foi avaliar a efetividade de um conjunto de procedimentos terapêuticos na erradicação de MRSA em 10 pacientes usuários de próteses totais com infecção persistente. Amostras de MRSA foram coletadas com swab em vários locais do corpo, como garganta, virilha, lesões de pele, axila e feridas abertas. A seguir, foram semeadas em placas contendo Manitol Salt Agar com 1 µg/mL de oxacilina, incubadas a 35 °C por 48 h e, decorrido esse período, as colônias foram identificadas. Além disso, foi testada, para todos os isolados, a resistência à meticilina e a suscetibilidade à oxacilina, vancomicina, rifampicina, ciprofloxacina, trimetoprim, sulfametoxazol, ácido fusídico, clindamicina, gentamicina e netilmicina. Amostras de MRSA também foram coletadas da prótese de 6 pacientes, semeadas em Manitol e incubadas por 48 h a 35 °C para, posteriormente, observar a presença de crescimento de colônias. Os procedimentos de erradicação consistiam de tratamento tópico (uso de creme contendo mupirocina 2 %, 3 vezes ao dia, nos locais do corpo colonizados), terapia antimicrobiana sistêmica (combinação de 2 antibióticos diferentes durante 10 a 16 dias) e o utilização de detergentes anti-sépticos de clorexidina (uso tópico diário). Com o objetivo de prevenir a recolonização, as próteses contaminadas foram reembasadas e mantidas por 10 h na temperatura de 100 °C. Em 6 pacientes, as amostras foram colhidas antes do primeiro ciclo de erradicação, em outros 2 pacientes, a primeira coleta foi realizada antes do segundo ciclo de erradicação e, nos outros 2 pacientes, a coleta foi feita apenas depois do tratamento de erradicação ter sido finalizado. Durante a terapia de descolonização, os pacientes não usaram suas próteses. Como resultado dos tratamentos, o MRSA foi erradicado de 7 pacientes, mas os outros 3

permaneceram portadores desse microrganismo, apesar da combinação de no mínimo 2 tratamentos de erradicação, sistêmico e tópico. Baseados nesses resultados, os autores concluíram que as próteses podem sustentar a colonização nasofaríngea persistente de MRSA e sugerem que, quando a erradicação desse microrganismo for considerada necessária, nos casos de contaminação nasal, oral ou faríngea, o tratamento térmico das próteses deve ser incluído.

Segundo Baysan et al.<sup>17</sup>, em 1998, materiais reembasadores resilientes são mais suscetíveis a adesão de microrganismos que os materiais de base de resina acrílica. Assim, o objetivo de seu estudo foi avaliar a efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de um material reembasador resiliente contaminado com microrganismos patogênicos. Corpos-de-prova (2 cm x 2 cm) de resina reembasadora resiliente (Molloplast-B) foram confeccionados e polimerizados em micro-ondas por 3 min a 650 W. Todos os corpos-de-prova foram esterilizados em autoclave, inoculados com os microrganismos testados (*C. albicans* ou *S. aureus*) e incubados aerobicamente a 37 °C. Após três dias de incubação, o meio de cultura foi descartado e os corpos-de-prova enxaguados cuidadosamente em 10 mL de solução de salina fosfatada tamponada (PBS) para remoção de células não aderentes. As amostras confeccionadas foram divididas em quatro grupos (três experimentais e um controle) com 10 amostras cada. Três grupos experimentais foram avaliados quanto aos procedimentos de desinfecção, sendo as amostras do grupo A submetidas à desinfecção em micro-ondas por 5 min a 650 W; as amostras do grupo B mantidas a seco em temperatura ambiente por 5 h; e as amostras do grupo C imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2 % durante a noite. Para

o grupo controle, as amostras foram enxaguadas e deixadas em solução de PSB por 5 h a temperatura ambiente. A seguir, os corpos-de-prova foram individualmente colocados em tubos com 10 mL de PSB e agitados por 15 min. Diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) foram realizadas em placas com Agar Sangue, que foram incubadas durante a noite a 37 °C. Após a incubação, as colônias foram contadas e o número de ufc/mm<sup>2</sup> (unidades formadoras de colônias por milímetro quadrado) foi calculado. Os resultados demonstraram que, em relação ao tratamento por micro-ondas, a imersão em hipoclorito de sódio promoveu uma redução relativamente maior do número de microrganismos. Entretanto, apenas o grupo do procedimento a seco apresentou uma redução significativa do número de células viáveis em relação aos demais grupos. Os autores recomendaram a utilização das micro-ondas como um método de desinfecção, uma vez que o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens para utilização na clínica odontológica, sobretudo em longos períodos de imersão, como efeitos deletérios sobre as resinas acrílicas das próteses e corrosão de componentes metálicos.

Em 1999, Dixon et al.<sup>36</sup> avaliaram a efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de resinas acrílicas contaminadas com *C. albicans* e seu efeito sobre a dureza desses materiais. Na primeira fase do experimento, foram confeccionados 45 corpos-de-prova (10 mm x 10 mm x 3 mm) de cada material, sendo três reembasadores resilientes (Molloplast-B, Permaflex e/ou Permasoft) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199). Os corpos-de-prova foram submetidos aos ensaios de dureza (durômetro Shore A) e inoculados com *C. albicans*. Após 48 h, 30 corpos-de-prova foram irradiados a seco por 5 min em potência máxima e o crescimento microbiológico foi avaliado por semeadura em

placas de Petri. A esterilização em longo prazo (2 semanas) foi observada pela análise de crescimento visível através da imersão dos corpos-de-prova em meio de Tioglicolato. Após 2 semanas, as leituras de dureza foram realizadas novamente para todos os corpos-de-prova. Para a segunda fase do experimento, 15 corpos-de-prova de cada material foram irradiados a seco pelos tempos de exposição de 10 ou 15 min e submetidos aos ensaios de dureza. Na terceira fase, 15 corpos-de-prova de cada material foram imersos em água e irradiados por 5 min em potência máxima. Para avaliar o efeito desse procedimento sobre a dureza, os corpos-de-prova foram irradiados por 5 vezes. De acordo com os resultados, a irradiação a seco por 5 min não esterilizou nenhum dos materiais avaliados. Além disso, os corpos-de-prova não imersos e irradiados por 10 e 15 min não foram eficientemente esterilizados para todos os materiais avaliados. Entretanto, uma esterilização efetiva foi observada após a irradiação por micro-ondas por 5 min quando os corpos-de-prova foram imersos em água. Os corpos-de-prova de todos os materiais não imersos e irradiados por 15 min e os corpos-de-prova imersos em água e irradiados por 5 min não apresentaram alteração de dureza clinicamente significativa. As 5 irradiações consecutivas de um mesmo corpo-de-prova resultaram em uma alteração significativa na dureza do material PermaSoft. Com base nos resultados, os autores concluíram que 5 min de irradiação foram suficientes para eliminar *C. albicans*, desde que os materiais testados estivessem imersos em água durante a exposição às micro-ondas.

Nikawa et al.<sup>77</sup> em 1999, realizaram uma revisão de literatura sobre os métodos empregados para limpeza de próteses e fizeram algumas sugestões sobre os métodos de higiene empregados. Mais de vinte artigos

avaliando a efetividade dos produtos para higienização das próteses foram analisados, bem como as vantagens e desvantagens de cada método. Os autores comentaram que o método mais comum para o controle do biofilme diário é a higienização mecânica com escova (com ou sem sabão, pasta ou abrasivo). Entretanto, vários estudos relataram que a escovação pode causar desgaste da resina acrílica da prótese e que este método por si só pode ser insuficiente para reduzir o número de microrganismos. Dessa forma, os autores relataram que a utilização de soluções químicas é indispensável no cuidado diário das próteses. Dentre as soluções químicas utilizadas, os autores citaram: hipoclorito de sódio, peróxidos, peróxidos neutros com enzimas, ácidos, e enxaguatórios para próteses. Os autores ainda observaram as características dos estudos experimentais utilizando biofilme in vivo e in vitro. Os estudos in vivo apresentam resultados diferentes quando comparados aos estudos in vitro. Em primeiro lugar, a quantidade de biofilme in vivo difere de paciente para paciente, ao contrário do biofilme in vitro, onde a quantidade do microrganismo para a contaminação das amostras é padronizado. Além disso, diferenças em relação aos microrganismos encontrados nos biofilmes da cavidade bucal e in vitro foram relatadas pelos autores. Os autores concluem alertando que a avaliação da efetividade dos diferentes agentes de limpeza na redução do biofilme deve ser estudada tanto em biofilme in vivo como em in vitro, desde que ambos têm demonstrado diferentes características, grau de complexidade e resistência a agentes antimicrobianos.

O mecanismo de transferência de calor de uma suspensão de *S. aureus* após a irradiação em micro-ondas foi avaliado por Yeo et al.<sup>132</sup>, em 1999. Culturas bacterianas de *S. aureus* foram inoculadas em meio nutriente,

incubadas a 37 °C por 8 h e centrifugadas por 10 min. Para a exposição às micro-ondas, foram utilizadas suspensões bacterianas em meio de cultura e água destilada estéril. Adesivos indicadores de temperatura foram aplicados em discos estéreis de aço inoxidável (15 x 5 mm). As suspensões bacterianas em meio de cultura ou água destilada foram pipetadas sobre as superfícies dos discos. Em seguida, os discos foram irradiados a 800 W em vários tempos de exposição. As potências absorvidas pelos discos de aço inoxidável e pelas suspensões bacterianas foram calculadas por uma equação de condução térmica. A análise de transferência de calor entre os microrganismos e a água destilada foi avaliada por um método específico capaz de calcular o nível tempo-dependente de absorção de energia do microrganismo e do líquido circundante ao mesmo. Os resultados evidenciaram que a viabilidade celular foi reduzida com o aumento do tempo de exposição, havendo uma inativação completa da suspensão bacteriana após 110 s, quando a temperatura atingiu o valor de 61,4 °C. O baixo índice de aumento de temperatura da suspensão bacteriana quando comparada com água destilada estéril ou meio de cultura testados sem inóculo foi atribuído pelos autores a uma significativa influência da eficácia de esterilização pelas micro-ondas nas propriedades térmicas dos microrganismos. Os autores concluíram que, quando o inóculo bacteriano sobre o disco de aço inoxidável foi submetido às micro-ondas, a condução de calor do disco de aço para o inóculo foi a causa do efeito bacteriostático, com absorção de 23,8 W de potência pelo aço e de 0,16 W pela suspensão bacteriana. Dessa forma, os autores sugeriram que a ação de eliminação de *S. aureus* em discos de aço inoxidável foi principalmente atribuída à transferência de calor do substrato de aço, com pouca energia absorvida diretamente da irradiação por micro-ondas.

A influência da higienização das próteses com soluções de limpeza específicas sobre as alterações de cor, textura e dureza Shore A foi avaliada por Tan et al.<sup>120</sup>, em 2000. Os autores compararam o efeito do tratamento com soluções de limpeza de prótese (perborato, persulfato ou hipoclorito) sobre as propriedades acima descritas de um reembasador resiliente a base de silicone (Molloplast B). Discos do reembasador foram processados sobre corpos-de-prova retangulares de uma resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 199). Para avaliação da textura superficial, cada amostra teve sua superfície dividida em 3 áreas: 1) sem tratamento; 2) rugosa ou 3) polida com pedra pomes fina. Cinco soluções de limpeza de prótese comerciais (Efferdent, Polident e Kleenite – a base de perborato de sódio; Sparkle-Dent – a base de persulfato; Javex/Calgon – a base de hipoclorito) e água (controle) foram usadas. Os corpos-de-prova foram imersos em cada uma das soluções ou água em 2 temperaturas: a 25 °C ou 55 °C, por um período de 10 min, 2 vezes ao dia. O procedimento foi repetido diariamente durante 4,5 meses. Para a solução de Sparkle-Dent, o tempo de imersão foi de 15 min, de acordo com as orientações do fabricante. As mensurações de cor, textura superficial e dureza Shore A foram realizadas antes e após os tratamentos. Os resultados demonstraram que o tempo de avaliação e uma interação entre o tempo e os agentes de limpeza utilizados tiveram influência significativa na a cor e na dureza. As soluções Efferdent e Polident resultaram em alteração de cor em superfícies rugosas comparado com o controle a 25 °C e comparado com Sparkle-Dent e controle a 55 °C. Para as regiões rugosas, Efferdent e Sparkle-Dent apresentaram maiores valores de dureza Shore A comparado com Javex/Calgon a 25 °C. Não foi observada diferença significativa na rugosidade após os tratamentos a 25 °C e

55 °C. Após o tratamento do reembasador resiliente com soluções contendo perborato, houve alteração de cor nas superfícies rugosas. Dessa forma, os autores concluíram que regiões rugosas contribuem para a alteração de cor e dureza.

O efeito de compostos iônicos associados à irradiação por micro-ondas sobre a inativação de microrganismos foi analisado por Watanabe et al.<sup>129</sup>, em 2000. Suspensões de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* foram cultivadas a  $2 \times 10^7$  ufc/mL. Para alguns experimentos, concentrações crescentes de NaCl, KCl e sacarose foram adicionados à suspensão. Um tubo contendo 3 mL da suspensão de cada microrganismo foi colocado em um erlenmeyer com 90 mL de água. Esse conjunto foi posicionado no centro do prato giratório do forno de micro-ondas e irradiado a 500 W durante vários tempos de exposição. Amostras de 0,1 mL foram removidas para contagem e a temperatura da suspensão celular foi determinada. Os resultados demonstraram que as células foram inativadas na mesma proporção em que houve um aumento na temperatura da suspensão celular. Assim, foi considerado que o efeito das micro-ondas nos microrganismos ocorreu, principalmente, devido ao calor gerado na suspensão celular. A adição de NaCl e KCl à suspensão aumentou os efeitos da irradiação por micro-ondas na inativação de *E. coli* e *C. albicans*. A adição de sacarose apresentou pouco efeito no aumento de temperatura e na inativação celular. Dessa forma, os autores observaram que soluções iônicas de alta eletrocondutividade refletem as micro-ondas da superfície da solução. Para esclarecer as contradições relacionadas à utilização de soluções iônicas, o efeito das condições circundantes no erlenmeyer foi estudado. O aumento da temperatura da solução dos tubos foi suprimido com o aumento do volume do

líquido. Os autores concluíram que, quando o volume da solução irradiada é menor ou quando a área superficial exposta às micro-ondas é ampla, há maior possibilidade da irradiação por micro-ondas aquecer todo o líquido contendo substâncias com alta perda dielétrica.

Por meio de análise *in vivo*, a efetividade da desinfecção de próteses totais, com solução de clorexidina ou irradiação por micro-ondas, foi avaliada como método adjunto no tratamento de estomatite protética por Banting, Hill<sup>9</sup>, em 2001. Trinta e quatro pacientes portadores de próteses totais superiores com esfregaços positivos para pseudohifas de *C. albicans* foram selecionados para um dos seguintes tratamentos: irradiação da prótese em micro-ondas ou imersão da prótese em solução clorexidina a 0,2 % (controle). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina 300000 IU 3 vezes ao dia) por 14 dias. As próteses selecionadas para o tratamento com as micro-ondas foram escovadas com sabão anti-séptico e água e, então, irradiadas por 1 min a 850 W em três dias diferentes (1º, 5º e 10º dia). Para o grupo controle, as próteses foram imersas na solução de clorexidina durante a noite por 14 dias, com renovação da solução a cada 2 dias. Essas próteses também foram escovadas em 3 dias diferentes (1º, 5º e 10º dias), estabelecendo parâmetro para comparação entre os grupos. Os resultados demonstraram que, após 14 dias, 53 % das próteses submetidas ao tratamento com micro-ondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem aumentou para 84 % para as próteses submetidas à imersão em clorexidina. Por outro lado, após esse mesmo período, os esfregaços citológicos referentes à mucosa palatina dos pacientes cujas próteses foram irradiadas apresentaram ¼ do risco de infecção dos tecidos palatinos em relação aos pacientes que tiveram suas

próteses imersas em clorexidina. Três meses após o tratamento, o grupo controle foi considerado cinco vezes mais suscetível a apresentar pseudohifas de *C. albicans* quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com as micro-ondas. Os autores concluíram que a exposição das próteses às micro-ondas foi efetiva para uma adequada desinfecção das próteses, sem ocasionar efeitos deletérios aparentes em suas propriedades.

No mesmo ano, Penna et al.<sup>86</sup>, com base no crescente número de focos de infecção em berçários hospitalares, realizaram um estudo para avaliar a eficácia de produtos sanitários de uso hospitalar contra as bactérias envolvidas nas mortes de bebês recém-nascidos. Os agentes químicos testados foram: digluconato de clorexidina; peróxido de hidrogênio; álcool isopropílico; dicloroisocianurato de sódio; etanol 70 %; etanol 70 % acrescido de glicerina 2 %; glutaraldeído; formaldeído; hipoclorito de sódio; ácido peracético (PAA); compostos de amônio quaternário (QACs); iodo polivinilpirrolidona aquoso com e sem lauril éter sulfato de sódio; iodo polivinilpirrolidona alcoólico em etanol 70 %; etanol 70 % adicionado de iodo e hipoclorito de sódio. As bactérias utilizadas nos experimentos foram: *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus*. Para determinar a eficácia dos agentes químicos, os autores determinaram o valor de CIM pelo método de diluições sucessivas em meio de cultura. A partir de uma solução do agente químico, diluições seriadas foram preparadas em Tryptic Soy Broth (TSB) inoculado ( $10^6$  ufc/mL). O valor de CIM foi identificado como a menor concentração do agente químico que resultou na inibição do crescimento dos microrganismos testados, após 24 h de incubação. Com os resultados obtidos no teste de CIM, foi observado que a redução das

populações de bactérias foi obtida com uma variação de: 59 a 156 mg/L de QACs (59 a 78 mg/L para *S. aureus*); 63 a 10.000 mg/L de digluconato de clorexidina (63 a 71 mg/L para *S. aureus*); 1.375 a 3.250 mg/L de glutaraldeído (1.375 a 1.875 mg/L para *S. aureus*); 39 a 246 mg/L de formaldeído (média de 156 mg/L para *S. aureus*); 43.750 a 87.500 mg/L de isopropanol ou etanol (média de 87.500 mg/L para *S. aureus*), onde a adição de iodo 1 % no etanol 70 % reduziu o CIM de *S. aureus* para 43.750 mg/L, bem como a adição de iodo 10 % reduziu para 21.870 mg/L; 469 a 2.500 mg/L de peróxido de hidrogênio 4 % (625 a 938 mg/L para *S. aureus*); 2.310 a 18.500 mg/L de PAA em solução a 3 % (4.600 mg/L para *S. aureus*). Os autores concluíram que a clorexidina não apresentou atividade inibitória sobre germinação de esporos e o microrganismo *A. calcoaceticus*, seguido por *E. cloacae* e *S. marcescens*, apresentaram resistência à maioria dos agentes testados. Eles enfatizaram ainda ser essencial controlar adequadamente a concentração dos produtos diluídos, o tempo de exposição ao produto, a limpeza da superfície antes da desinfecção e o desenvolvimento de programas de higiene para padronizar a forma como os agentes químicos devem ser manuseados.

Ainda no mesmo ano, Smith et al.<sup>111</sup> realizaram um estudo de revisão sobre a colonização e infecção estafilocócica da cavidade oral e sua influência na saúde sistêmica. Nessa revisão, os autores citam artigos em que não há tendências claras relacionadas com idade e presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade oral, uma vez que espécies desse microrganismo foram isoladas da flora bucal de crianças (1 – 5 anos) e adultos (27 – 84 anos). Foi observado, também, que dispositivos protéticos na cavidade oral podem atuar como reservatórios microbianos, podendo contribuir para a infecção de outros

locais do corpo ou para a infecção cruzada entre pacientes e profissionais da saúde. Os autores relataram, ainda, que a prevenção da transmissão de MRSA tem se tornado cada vez mais importante devido ao aumento da prevalência deste patógeno. Frequentemente são realizadas tentativas para erradicar a transmissão de MRSA de indivíduos colonizados, mas experiências clínicas demonstraram que essa erradicação pode ser difícil. A mupirocina raramente é efetiva na remoção da colonização orofaríngea por MRSA. A erradicação é alcançada com o uso de rifampicina e ácido fusídico associados ao uso tópico da mupirocina. Com base nos dados levantados, foi concluído que o papel dos *Staphylococcus* spp. na flora bucal ainda é pouco conhecido, havendo um crescente interesse pelos pesquisadores no estudo de microrganismos oportunistas da cavidade oral que crescem em biofilme e tendem a ser menos suscetíveis a uma variedade de agentes antimicrobianos, como é o caso do MRSA. Os autores sugeriram que trabalhos futuros podem oferecer avanços e novas informações sobre a origem da infecção estafilocócica e conceitos de profilaxia antibiótica em pacientes de risco submetidos a tratamento odontológico, resultando, assim, em maior sucesso na erradicação da disseminação de cepas de MRSA.

Em 2001, Terpenning et al.<sup>122</sup> investigaram a importância dos fatores médicos e odontológicos na pneumonia aspirativa em população de idosos. Foram selecionados para esse estudo 358 pacientes acima de 55 anos de idade, internados em ambulatórios, hospitais e casas de repouso. No estudo anual de acompanhamento do desenvolvimento da pneumonia, foram incluídos os dados coletados na visita inicial e de acompanhamento. Esses dados consistiam em: (1) entrevista com os dados demográficos, história médica e

odontológica detalhada, condições atuais de saúde, uso de medicamentos, estado funcional, xerostomia, alimentação, comportamentos relacionados à saúde; (2) revisão dos registros de prontuários e banco de dados do hospital; (3) exame clínico odontológico completo para avaliar as condições de higiene bucal, cárie dentária, doença periodontal, número de dentes e eficiência mastigatória. Durante as visitas, foram realizadas as culturas de saliva, garganta e placas dentárias e testes salivares incluindo de anticorpos IgA. Após a visita inicial, os participantes do estudo foram observados em intervalos anuais por até 9 visitas. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: um para os 218 indivíduos dentados e outro que inclui todos os 358 indivíduos (dentados e desdentados). Os controles foram indivíduos que não desenvolveram qualquer tipo de pneumonia. Foi observado que 50 pacientes desenvolveram pneumonia aspirativa durante o período do estudo, sendo que 28 deles eram dentados. Houve diferença significativa na incidência de pneumonia aspirativa para os 2 grupos avaliados (dentados e desdentados), quando considerado o local em que o paciente habitava no momento da entrada no estudo (ambulatório, hospital ou casa de repouso). Os resultados demonstram a importância do controle de placa bacteriana e do tratamento de caries dentárias e doenças periodontais na redução significativa da presença de *S. aureus* na cavidade oral, diminuindo, assim, a incidência de pneumonia aspirativa.

Tendo em vista o amplo espectro de atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, Estrela et al.<sup>42</sup>, em 2002, realizaram uma ampla revisão de literatura com o objetivo de discutir o mecanismo de ação desta solução a partir das suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas. Segundo os autores, esta solução é capaz de promover alterações celulares biossintéticas, alterações

no metabolismo celular, destruição de fosfolipídios pela formação de cloraminas, que interferem no metabolismo celular, pela ação oxidante, com inibição enzimática irreversível nas bactérias, e pela degradação de ácidos graxos e lipídeos. Além disso, o hipoclorito de sódio é uma base forte ( $\text{pH} > 11$ ) e seu pH elevado pode alterar a integridade da membrana citoplasmática através de injúrias aos componentes orgânicos e ao transporte de nutrientes, ou por meio da degradação de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática. Esta reação causa alteração da biossíntese celular e danos irreversíveis à mesma, resultando em morte celular. Além disso, os autores relataram que o hipoclorito de sódio é recomendado pela maioria dos cirurgiões dentistas por ser, além de potente antimicrobiano, uma solução biocompatível em baixas concentrações.

A morbidade e mortalidade dos idosos dependentes, como resultado de pneumonia aspirativa, tem sido reconhecida como um importante problema de saúde geriátrica. Com base nessas informações, o objetivo do estudo de Sumi et al.<sup>116</sup>, em 2002, foi avaliar a microflora do biofilme presente em próteses, identificando a presença de microrganismos causadores de doenças respiratórias em idosos dependentes. Participaram desse estudo 50 pacientes idosos dependentes (24 mulheres e 26 homens), com idade entre 60 e 89 anos, usuários de próteses totais superiores. Esses pacientes não apresentavam doença oral ativa ou diabetes e nenhuma história de terapêutica antimicrobiana nas 8 semanas que antecederam o estudo. Todas as próteses estavam sendo utilizadas por, pelo menos, 2 anos e, no máximo, 18 anos. Para a coleta das amostras, a superfície interna da prótese foi cuidadosamente seca por uma gaze estéril, para evitar a contaminação pela saliva, e a placa

bacteriana foi friccionada com um swab. Todas as amostras microbiológicas orais foram coletadas por um único examinador. Em seguida, as amostras foram semeadas em placas e incubadas a 35 °C por 48 h, sob condições aeróbias. As colônias isoladas foram repicadas e a prevalência de potenciais patógenos respiratórios foi identificada pelo método de cultura. Neste estudo, os indivíduos foram considerados colonizados por patógenos respiratórios quando *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* ou *E. coli* fossem isolados de qualquer amostra protética. Foi observado que, em 23 dos 50 casos (46 %), houve a presença de patógenos respiratórios (18 espécies) nas próteses. A maioria desses patógenos apresentava potencial para causar infecção respiratória. Os organismos aeróbios predominantes foram *Streptococcus* spp. (98 %), *Candida* spp. (80 %) e *Neisseria* spp. (64 %). Os patógenos respiratórios mais frequentemente encontrados foram *E. cloacae* (18 %), *K. pneumoniae* (16 %) e *S. aureus* (10 %). Considerando esses aspectos, os autores concluíram que a placa existente nas próteses deve ser considerada um reservatório de patógenos respiratórios, podendo contribuir para a ocorrência de pneumonia aspirativa em idosos dependentes. Portanto, a manutenção de uma boa higiene das próteses pode, por si só, reduzir a colonização da orofaringe por esses patógenos e prevenir o aparecimento de infecções, como a pneumonia aspirativa.

Cosgrove et al.<sup>30</sup>, em 2003, realizaram uma meta-análise para avaliar os efeitos da resistência à meticilina na mortalidade em bacteremias causadas por *S. aureus*. Para isso foram pesquisados, no banco de dados MEDLINE, estudos de bacteremia por *S. aureus* publicados durante o período de

1 de janeiro de 1980 até 31 de dezembro de 2000. Esse levantamento foi realizado por 2 pesquisadores de forma independente, que selecionaram estudos com as seguintes informações: país de origem e período do estudo; o número e a taxa de mortalidade para pacientes com bacteremia por MRSA e MSSA; porcentagem de casos originados por contaminação hospitalar; tempo de permanência hospitalar antes do início da infecção; idade média do paciente; comorbidade primária; fonte da bacteremia; presença de surto de infecção de MRSA; método de ajustamento por sexo, idade, gravidade da doença e permanência em UTI; adequação da terapia; e taxa de probabilidade bruta e ajustada. Os autores observaram que a análise dos estudos foi limitada por conterem dados sobre diferentes populações de pacientes e devido à falta de um método validado de ajuste para a gravidade da doença em pacientes com infecções. No entanto, reunindo os dados disponíveis, foi sugerido que pacientes diagnosticados com bacteremia por MRSA apresentam maior risco de mortalidade quando comparados àqueles com bacteremia por MSSA. Informações detalhadas sobre a origem da bacteremia, adequação da terapêutica antimicrobiana e os efeitos do atraso no tratamento adequado dos pacientes com bacteremia por MRSA não eram esclarecidas. Dessa forma, foi concluído que bacteremia por MRSA possui maior mortalidade que a bacteremia por MSSA e que há necessidade de outras investigações para esclarecer se os esforços devem ser direcionados para a detecção precoce de MRSA, antecipando, assim, a aplicação de terapia apropriada ou modificando a antibioticoterapia com novos agentes, combinações de drogas ou diferentes doses. Os autores ressaltaram, ainda, o importante papel do controle de infecção e uso adequado de antibióticos.

O MRSA é um grande problema em UTIs na maioria dos países. Apesar das recomendações para a identificação e isolamento de pacientes com MRSA, existe pouca uniformidade na abordagem das UTIs com relação aos procedimentos básicos de controle de infecção. Dessa forma, Hails et al.<sup>47</sup>, em 2003, avaliaram a prevalência de MRSA e a variação na política de controle de infecção em UTIs na Inglaterra. A variação foi observada em termos de triagem do paciente, seleção da equipe de profissionais, procedimentos no controle de infecção, isolamento ou acompanhamento de pacientes colonizados/infectados. Os dados de prevalência mostraram que 16,2 % dos pacientes internados em UTIs eram reconhecidamente colonizados ou infectados com MRSA. Alas de isolamento estavam presentes em 196 das UTIs (90 %), mas a política de trabalho variava consideravelmente. Em 28 hospitais (13 %), todos os pacientes internados em UTIs eram mantidos em alas separadas. Pacientes MRSA-positivo não eram mantidos em alas separadas em 81 % dos hospitais. Além disso, os autores avaliaram os funcionários de 35 % das UTIs, observando que luvas e aventais eram usados por 92 % da equipe ao manusear qualquer paciente, enquanto que o restante fazia o uso desses paramentos apenas com pacientes isolados. Com base nos dados obtidos, os autores destacaram a falta de uma política padronizada consistente nas UTIs sobre a triagem, isolamento e práticas de erradicação do MRSA.

Neppelenbroek et al.<sup>74</sup>, em 2003, avaliaram a efetividade da irradiação por micro-ondas na esterilização de resinas rígidas para reembsamento imediato. Corpos-de-prova (10 x 10 x 1 mm) de três resinas reembadoras rígidas (Kooliner, Tokuso Rebase e Ufi Gel Hard) foram confeccionados e esterilizados por meio de óxido de etileno. Os corpos-de-prova

foram, então, individualmente inoculados ( $10^7$  cfu/mL) com meio de cultura TSB, contendo um dos seguintes microrganismos: *C.albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Após 48 h de incubação a 37 °C, os corpos-de-prova foram agitados por 1 min e deixados em repouso por 9 min, seguido de nova agitação para suspender qualquer microrganismo aderente. Após a inoculação, 40 corpos-de-prova de cada material foram imersos em 200 mL de água e irradiados a 650 W por 6 min. Quarenta corpos-de-prova não irradiados foram utilizados como controle positivo. A seguir, 25 µL da suspensão resultante das diluições seriadas de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  foram semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos para cada microrganismo. Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e as colônias foram quantificadas em ufc/mL. Os corpos-de-prova irradiados foram imersos em meio de cultura e incubados a 37 °C por 7 dias. Vinte corpos-de-prova foram preparados para microscopia eletrônica de varredura. Todos os corpos-de-prova demonstraram efetiva esterilização após a irradiação em micro-ondas. A análise em microscópio indicou alteração na morfologia celular dos microrganismos após a irradiação. Os corpos-de-prova irradiados e incubados por 7 dias não demonstram crescimento microbiológico visível no meio de cultura. Segundo os autores, a esterilização por micro-ondas por 6 min a 650 W provou ser um método efetivo para a esterilização de resinas reembasadoras rígidas.

Em 2003, Pavarina et al.<sup>82</sup> avaliaram o efeito de desinfetantes químicos (perborato de sódio a 3,78 %, clorexidina a 4 % e hipoclorito de sódio a 1 %) sobre a resistência à flexão de resinas acrílicas para base de próteses (Lucitone 550 e QC-20). Os corpos-de-prova (25 x 10 x 65 mm) foram imersos em clorexidina 4 % por 1 min e então submetidos à imersão em uma das

soluções desinfetantes por 10 min. O grupo controle foi mantido em água destilada por  $50 \pm 2$ h. O procedimento de desinfecção foi realizado 2 vezes, com o objetivo de simular o envio da prótese ao laboratório e o retorno da mesma para o paciente. Após a desinfecção, as amostras foram submetidas à análise de resistência à flexão, em máquina de ensaios universal, a uma velocidade de 5 mm/min. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa na resistência à flexão entre todos os grupos avaliados. A resina Lucitone apresentou maiores valores de resistência à flexão comparada com a resina QC-20, independentemente da solução utilizada.

No mesmo ano, Pavarina et al.<sup>83</sup> verificaram a influência de soluções desinfetantes na dureza Vickers de dentes de resina acrílica. Foram utilizadas 2 marcas de dentes artificiais (Dentron e Vipident) e 3 tipos de solução desinfetante (digluconato de clorexidina 4 %, hipoclorito de sódio 1 % e perborato de sódio 3,78 %). As amostras foram confeccionadas pelo posicionamento dos dentes artificiais no centro de cilindros de resina acrílica termopolimerizável (Lucitone 550), armazenadas em água destilada a 37 °C por 48 h e, após esse período, a dureza inicial (carga de 100 g por 30 s) foi determinada. Em seguida, as amostras foram divididas em 4 grupos, sendo cada um submetido a 2 imersões em cada uma das soluções desinfetantes ou água por 10 min. A dureza superficial foi novamente avaliada após os tratamentos e após o armazenamento em água destilada por 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Não foram encontradas diferenças significantes na dureza Vickers de dentes de resina acrílica para todas as soluções de imersão. Entretanto, uma diminuição contínua na dureza foi verificada após o armazenamento em água. Assim os autores concluíram que as superfícies dos dentes da prótese de resina acrílica

apresentaram uma diminuição na dureza após imersão em água, independente da solução desinfetante.

A eficácia da atividade bactericida de alguns agentes anti-sépticos bucais foi investigada, em 2003, por Smith et al.<sup>112</sup>, contra 6 isolados de *S. aureus*: 2 isolados clínicos resistentes à meticilina não provenientes da cavidade oral (SMRSA-108a e SMRSA-112a), 2 isolados clínicos resistentes à meticilina provenientes da cavidade oral (R387 e R388), uma cepa clínica resistente à meticilina (EMRSA15) e uma cepa de referência suscetível à meticilina (ATCC 29213). Foram escolhidos para o teste os seguintes produtos de higiene bucal disponíveis no mercado: creme dental Colgate Total e os enxaguatórios bucais Corsodyl, Listerine, Plax, Oral-B e Fluorigard. Os enxaguatórios bucais foram testados na concentração de 80 %. O creme dental foi diluído em água destilada estéril, na proporção de 1 g/mL, centrifugado e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios bactericidas. Para determinação da atividade bactericida, as suspensões bacterianas ( $1,5 - 5 \times 10^8$  ufc/mL) foram misturadas com as soluções anti-sépticas preparadas e avaliadas após os tempos de exposição de 30 s, 1, 5, 30 e 60 min. Em seguida, o anti-séptico foi neutralizado e as contagens foram determinadas em 24 e 48 h. Foi observado que todos os isolados de *S. aureus* foram mortos dentro de um tempo de exposição de 30 s com os enxaguatórios bucais Corsodyl e Listerine e de 5 min com o enxaguatório bucal Oral-B. O Fluorigard foi ineficaz na redução bacteriana para todos os isolados testados ao longo de um tempo de exposição de 60 min. Todos os isolados de *S. aureus* foram mortos dentro de 30 s pela suspensão de Colgate Total e pelo enxaguatório bucal Plax, com exceção dos isolados orais de MRSA, que demonstraram um aumento na sobrevivência quando expostos a esses produtos.

Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que estes produtos podem ser úteis como parte de um programa de descolonização da orofaringe. Eles ressaltam ainda que os isolados orais apresentaram menor suscetibilidade a alguns desses produtos, como é o caso da solução de creme dental. Esta sensibilidade reduzida pode refletir uma forma de adaptação à exposição diária a este produto. Entretanto, os autores sugeriram que trabalhos adicionais futuros, com maior número de isolados, são necessários para confirmar esta hipótese.

Barnabé et al.<sup>11</sup>, em 2004, realizaram um estudo in vivo avaliando a eficácia de sabão de coco e hipoclorito de sódio na redução da estomatite protética, *Streptococcus mutans* e *C. albicans*. Foram selecionados 28 pacientes portadores de próteses totais superiores e obtidos 2 grupos de estudo. Grupo controle: os pacientes foram instruídos a realizar escovação das próteses com sabão de coco e sua imersão em água destilada durante 10 min; Grupo experimental: os pacientes foram instruídos a realizar escovação das próteses com sabão de coco e sua imersão em hipoclorito de sódio a 0,05 % durante 10 min. O experimento teve duração de 15 dias. Foram realizadas coleta de biofilme das próteses e avaliação da mucosa do palato, segundo a classificação de Newton, para verificação do efeito dos tratamentos, no início do experimento e ao seu final. Os dados mostraram que 19 dos 28 pacientes apresentaram lesões clínicas características de estomatite protética na primeira avaliação clínica. Inicialmente, 57,14 % dos pacientes apresentaram elevadas taxas de *Candida* spp. associada a *S. mutans*. Após os tratamentos, somente 3 pacientes mostraram lesões características de estomatite protética e houve redução na quantidade de *C. albicans* e *S. mutans*, sem diferença significativa entre os dois

grupos. Dessa forma, os autores concluíram que ambos os protocolos de limpeza instituídos promoveram redução significativa da estomatite protética.

Em 2004, Lamfon et al.<sup>59</sup> avaliaram, in vitro, a capacidade de formação de biofilme de *C. albicans* e a sua suscetibilidade a agentes antifúngicos (fluconazol, miconazol e clorexidina) em diferentes fases do biofilme (2, 6, 24, 48 e 72 h). Discos de acrílicos foram confeccionados para o estudo. Sobre estes discos, foi realizada a formação do biofilme em um equipamento dinâmico - Sistema do tipo fermentador de profundidade constante (CFFF), em ambiente aeróbio a 37 °C. Após a formação do biofilme, os discos foram removidos e tratados com fluconazol ou miconazol (256 mg/mL) por 24 ou 48 h, ou clorexidina (0,019 %) por 5 ou 15 min. Após os tratamentos, os discos foram lavados e transferidos para meio de crescimento, a fim de realizar os procedimentos de quantificação e contagem de colônias aderidas. De acordo com os resultados, houve um aumento constante, ao longo do tempo, nas unidades formadoras de colônia aderidas à resina acrílica. O crescimento do biofilme sobre os corpos-de-prova foi maior para as amostras tratadas com fluconazol e miconazol e menor para as amostras tratadas com clorexidina. Após formação de biofilme de 2 e 6 h sobre os corpos-de-prova, observou-se redução na quantidade de biofilme após tratamento com fluconazol por 24 h. Para o biofilme de 24 h, foi verificada maior resistência e não houve redução significativa em sua quantidade quando comparado com o grupo controle. Os biofilmes de 2 e 6 h, quando expostos ao miconazol por 24 h, apresentaram redução significativa de colônias quando comparados com o controle. Entretanto, não houve redução na viabilidade para biofilme de 24, 48 e 72 h após o tratamento de miconazol. A exposição dos corpos-de-prova à clorexidina

promoveu significativa redução na formação do biofilme nos tempos de 2, 6 e 24 h. Porém, não foi observada redução significativa para os biofilmes de 48 e 72 h. Os dados mostraram que a formação e a maturação do biofilme são altamente resistentes aos agentes antifúngicos e antimicrobianos testados. Ainda, foi concluído que há uma grande divergência no grau de suscetibilidade do biofilme de *C. albicans* entre fluconazol, miconazol e clorexidina, sendo esta a mais efetiva.

Estudos de cultura bacteriana têm mostrado que a placa dentária é um reservatório de patógenos respiratórios em pacientes idosos debilitados, hospitalizados ou internados em asilos, colocando-os em risco de pneumonia bacteriana. O estudo de Didilescu et al.<sup>35</sup>, em 2005, teve como objetivo avaliar a higiene bucal de pacientes hospitalizados com doença pulmonar crônica (HDPC), a presença de patógenos respiratórios na placa supragengival desses pacientes e comparar os dados dos pacientes HDPC com aqueles de pacientes sem doença pulmonar. A colonização da placa supragengival de 34 pacientes HDPC, excluindo aqueles com tuberculose e com menos de 20 dentes, foi analisada utilizando um painel de DNA genômico produzido a partir de 8 patógenos respiratórios e 8 patógenos bucais. Trinta e um pacientes saudáveis serviram de referência. Foi observada presença de patógenos respiratórios em 85,3 % das placas de pacientes hospitalizados e em 38,7 % das placas de indivíduos saudáveis. Os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *E. cloacae* foram encontrados mais frequentemente entre os pacientes hospitalizados. Esses resultados sugeriram que a placa dentária de pacientes HDPC e pacientes saudáveis age como um reservatório de patógenos respiratórios, com uma taxa significativamente mais elevada para

os pacientes HDPC. Foi concluído, portanto, que uma atenção especial deve ser direcionada aos cuidados de higiene oral que reduzem a carga microbiana ou de colonização pelo patógeno em indivíduos suscetíveis a infecções respiratórias, prevenindo, assim, a pneumonia nosocomial.

Neppelenbroek et al.<sup>75</sup>, em 2005, verificaram o efeito de desinfecções e armazenamento em água na dureza de resinas termopolimerizáveis. Corpos-de-prova cilíndricos foram confeccionados com os materiais Lucitone 550 e QC-20, polidos e mantidos em água destilada a 37 °C por 48 h. Doze mensurações de dureza em cada corpo-de-prova foram realizadas em microdurômetro equipado com diamante Vickers, sob carga de 50g por 30 s. Em seguida, os discos foram desinfetados em solução de digluconato de clorexidina a 4 % por 1 min, lavados em água e imersos por 10min em uma das seguintes soluções: digluconato de clorexidina a 4 %, hipoclorito de sódio a 1 % e perborato de sódio a 3,78 %. Estes tratamentos foram repetidos 4 vezes e, em seguida, as mensurações de dureza foram repetidas. O grupo controle foi mantido em água destilada por 56 min. Após as desinfecções, os corpos-de-prova foram mantidos em água destilada a 37 °C por 15, 30, 60, 90 e 120 dias e mensurações de dureza foram feitas em cada um dos intervalos. Os resultados demonstraram diferenças significantes na dureza em função do tempo. Também houve diferença significativa na interação resina de base e tempo. Quando as mensurações de dureza foram comparadas, uma diminuição na dureza foi observada após a desinfecção, independentemente da solução desinfetante utilizada. Entretanto, essa diminuição foi revertida após 15 dias de armazenamento em água. Não houve diferença significativa nos valores de dureza entre as amostras mantidas em água em todos os intervalos.

Para ambas as resinas, foi observado um aumento contínuo na dureza até os 60 dias e, após este período, não foram notadas alterações. A resina QC-20 mostrou redução significativa nos valores de dureza quando comparada com a Lucitone, em todas as condições experimentais.

Azevedo et al.<sup>6</sup>, em 2006, avaliaram a dureza e a rugosidade de duas resinas reembasadoras (Kooliner e Duraliner II) e uma resina acrílica para base de prótese termopolimerizável (Lucitone 550) após imersão em soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio a 1 % e clorexidina a 4 %). A dureza e a rugosidade foram avaliadas uma hora após a polimerização dos materiais, após 48 h de armazenamento em água a  $37 \pm 2$  °C, após 2 ciclos de desinfecção (20 min), após 7 dias de armazenamento nas soluções desinfetantes e após 7 dias de armazenamento em água. A dureza de todos os materiais manteve-se inalterada após 2 ciclos de desinfecção. Após 7 dias de imersão em ambas as soluções, somente a resina Duraliner apresentou significativo aumento nos valores de dureza. As soluções não causaram efeito sobre a rugosidade de todos os materiais. O armazenamento em água por 7 dias resultou em aumento significativo na dureza para os materiais Kooliner e Duraliner (sem tratamento térmico). Para todos os materiais, o armazenamento em água não influenciou a rugosidade superficial.

Também em 2006, o estudo de Silva et al.<sup>105</sup>, teve por objetivo avaliar a efetividade da irradiação por micro-ondas na esterilização de próteses totais. Oitenta próteses totais padronizadas foram confeccionadas e submetidas à esterilização por meio de óxido de etileno. As próteses foram, individualmente, inoculadas ( $10^7$  ufc/mL) com meio de cultura TSB contendo um dos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Após 48 h de

incubação a 37 °C, 40 próteses foram imersas em 200 mL de água e irradiadas a 650 W por 6 min. Quarenta amostras não irradiadas foram utilizadas como controle. As diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  foram obtidas e 25 µL da suspensão resultante de cada diluição foram semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos para cada microrganismo. Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Após a incubação, as colônias foram quantificadas em ufc/mL. Para verificar a efetividade da exposição às micro-ondas em longo prazo, as amostras irradiadas foram imersas em meio de cultura e incubadas a 37 °C por 7 dias. Não houve crescimento microbiano após 48 h para as próteses contaminadas com *C. albicans*, *S. aureus* e *B. subtilis*. Um pequeno número de colônias foi observado em 2 placas de Petri para o microrganismo *P. aeruginosa*. Após 7 dias de incubação a 37 °C, houve crescimento microbiológico em 3 culturas de TSB, sendo 2 para *P. aeruginosa* e 1 para *B. subtilis*. Todas as próteses totais do grupo controle apresentaram crescimento microbiano nas placas de Petri após 48 h de incubação a 37 °C. A irradiação por micro-ondas por 6 min a 650 W provou ser um método rápido e efetivo para desinfecção das próteses totais contaminadas com *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, além de promover a esterilização das próteses inoculadas com *C. albicans* e *S. aureus*.

Campanha et al.<sup>23</sup>, em 2007, investigaram os efeitos da irradiação por micro-ondas sobre células de *C. albicans* por meio de parâmetros de contagem celular e de liberação de substâncias intracelulares. Para isso, foram obtidas culturas de *C. albicans* de 24 h em meio de cultura TSB a partir de cepas padrão. As células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 400 mL de água destilada gelada na concentração de  $10^8$  ufc/mL. Essa suspensão foi

dividida em experimental e controle. A suspensão experimental (200 mL) foi colocada em um béquer de 500 mL contendo uma prótese total acrílica estéril e irradiada por micro-ondas durante 6 min a 650 W. A suspensão controle não foi submetida à irradiação. Para ambas as suspensões, diluições seriadas foram realizadas para contagem celular em câmara de Neubauer, utilizando a entrada do corante azul de metileno como indicativo de alteração de permeabilidade de membrana. Alíquotas diluídas também foram semeadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Alíquotas não diluídas foram analisadas quanto à densidade óptica. Para a quantificação de substâncias liberadas, as células foram eliminadas das suspensões por centrifugação e filtração e a solução resultante foi liofilizada. O conteúdo liofilizado foi ressuspenso em 5 mL de água destilada e analisado pelos métodos Microprote e Sensiprote, para quantificação de proteínas; potenciometria, para quantificação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ; Liquiform, para quantificação de  $\text{Ca}^{++}$ ; e densidade óptica a 260 nm, para quantificação de ácidos nucleicos. Todos os testes foram realizados em duplicata e repetidos em 8 dias diferentes. Não foram encontradas diferenças entre as suspensões experimental e controle quando foram comparadas as suas médias de densidade óptica. As células da suspensão controle apresentaram-se íntegras, enquanto que as da suspensão experimental não apresentaram integridade de membrana, de acordo com a entrada de azul de metileno. Não foram observadas colônias viáveis de *C. albicans* nas placas de Petri da suspensão experimental, enquanto a suspensão controle apresentou contagem da ordem de  $10^8$  ufc/mL. A liberação de proteínas da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle, tanto pelo sistema Microprote quanto para o sistema Sensiprote. A liberação de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e ácidos nucleicos da suspensão experimental foi

significativamente maior do que a da suspensão controle. Pela técnica de potenciometria, não foi detectada a presença de  $\text{Na}^+$  em nenhuma das suspensões. Os autores concluíram que, para a maioria dos parâmetros utilizados, a suspensão experimental apresentou valores significativamente menores de contagem de células e maiores de substâncias liberadas. Entretanto, a irradiação por micro-ondas não causou redução na densidade óptica das células em suspensão.

Consani et al.<sup>29</sup>, em 2007, avaliaram o efeito da desinfecção por micro-ondas sobre a adaptação da base de próteses superiores utilizando dois métodos diferentes de prensagem. Quarenta modelos de gesso encerados foram incluídos em muflas e submetidos aos métodos de prensagem tradicional (PT) e Sistema de Restrição (SR) (n=20). O SR consiste em 2 placas de ferro para segurar a mufla, durante a prensagem definitiva, mantendo-a fechada depois da liberação de pressão. A resina acrílica (Clássico) foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e polimerizada em água a 74 °C por 9 h. Após o esfriamento das muflas, as bases de prótese foram removidas e submetidas ao acabamento convencional com pedras abrasivas e pasta de polimento. As bases de prótese para cada método (PT ou SR) foram divididas em 2 grupos (n=10): bases submetidas à desinfecção (SD) em 150 mL de água destilada em um forno de micro-ondas a 650 W por 3 min; e bases que não foram desinfetadas (ND). Três cortes transversais foram feitos em cada conjunto modelo/base de resina, correspondentes à distal de caninos, mesial dos primeiros molares e região palatina posterior. As medições foram feitas nas bases por meio de um micrômetro óptico em 5 pontos para cada corte para determinar a adaptação: limites marginais esquerdos e direitos, cristas esquerdas e direitas e linha média.

A diferença de valores de dimensão (mm) para bases de prótese total do grupo ND preparadas pelo método SR foram significativamente menores ( $0,16 \pm 0,05$ ) quando comparado ao método TFC ( $0,21 \pm 0,05$ ). A desinfecção melhorou significativamente a adaptação das bases preparadas pelo método PT ( $0,17 \pm 0,03$ ), quando comparadas com as bases ND ( $0,21 \pm 0,05$ ). Quando as bases foram preparadas pelo método PT, a desinfecção melhorou significativamente a adaptação da base apenas na distal dos caninos (ND =  $0,13 \pm 0,01$ , DP =  $0,11 \pm 0,03$ ) e na região posterior do palato (ND =  $0,25 \pm 0,04$ ; DP =  $0,21 \pm 0,01$ ). Com base nos resultados, os autores concluíram que a desinfecção por energia de micro-ondas melhorou a adaptação das bases de próteses preparadas pelo método PT, mas não alterou estatisticamente a adaptação das bases preparadas pelo método SR.

O objetivo do estudo realizado por Maeda et al.<sup>63</sup>, em 2007, foi analisar a atividade bactericida de 5 soluções de limpeza de próteses disponíveis no mercado (Steradent Triple Action, Tesco Denture Cleanser, Tesco "Value" Denture Cleanser, Steradent Active Plus e Detural) contra 6 cepas de MRSA no estado planctônico (5 cepas diferentes de MRSA associadas a infecções hospitalares - HA-MRSA; e uma cepa de MRSA associada a infecção na comunidade - CA-MRSA). As cepas foram semeadas em placas contendo meio de cultura específico e padronizadas com densidade celular na escala 0,5 de McFarland. Para a realização dos testes, todos os inóculos foram adicionados, individualmente, em cada solução de limpeza e avaliados em intervalos de tempo de zero, 10, 20 min e 17 h. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento para a realização da contagem de bactérias viáveis (ufc/mL). Os resultados demonstraram que a forma planctônica das cepas de

HA-MRSA e CA-MRSA não permaneceram viáveis após 10 min de exposição a todas as soluções de limpeza. Os autores concluíram que estas soluções de limpeza podem ser úteis na redução do número de MRSA.

O objetivo do estudo de Simor et al.<sup>109</sup>, em 2007, foi determinar a eficácia de uma terapia utilizando a combinação de agentes antimicrobianos tópicos e sistêmicos (lavagens com digluconato de clorexidina e mupirocina intranasal somadas à rifampicina oral e doxiciclina) na erradicação da colonização por MRSA. Foram incluídos nesse estudo pacientes colonizados por MRSA, internados em 8 hospitais de Toronto, Hamilton e Ontário, entre 1 de julho de 2000 e 30 junho de 2003. Os pacientes foram considerados colonizados com MRSA quando o microrganismo foi obtido pela cultura de amostras de um ou mais locais do corpo, em 2 momentos distintos, dentro de 2 semanas. Para determinar a eficácia da terapia de descolonização, os pacientes colonizados por MRSA foram selecionados de forma aleatória para receber tratamento com: lavagens diárias com o digluconato de clorexidina a 2 % por 7 dias, aplicação de pomada de mupirocina a 2 % (~ 1 cm) na cavidade nasal (3 vezes ao dia), rifampicina (300 mg, 2 vezes ao dia) e doxiciclina (100 mg, 2 vezes ao dia). As amostras para cultura de MRSA foram obtidas a partir da cavidade nasal anterior, região perianal, lesões de pele, local de saída de cateter ou outros dispositivos médicos e em qualquer outro sítio contaminado por MRSA. O acompanhamento foi semanal, durante 4 semanas, e depois mensal, por um período adicional de 7 meses. Para a realização dos experimentos, os swabs coletados foram incubados durante a noite em TSB contendo cloreto de sódio a 7,5 % e 1 % de Manitol. Em seguida, as amostras foram subcultivadas em Manitol Salt Agar suplementado com oxacilina (2 µg/mL) e incubadas a 37 °C

por 48 h. A identificação do MRSA foi por meio de métodos padronizados. Com base nos dados obtidos, foi observado que, dos 146 pacientes incluídos no estudo, 112 pacientes (87 tratados e 25 não tratados) foram acompanhados por pelo menos 3 meses. Nesses 3 meses, 64 pacientes tratados (74 %) e 8 pacientes não tratados (32 %) tiveram resultados negativos para a cultura de MRSA. Essa diferença permaneceu significativa durante os 8 meses de acompanhamento, quando 54 % dos pacientes tratados tiveram resultados negativos para a cultura MRSA. Os resultados da análise multivariada indicaram que a presença de um isolado resistente à mupirocina (5 % dos isolados) foi associada à falha do tratamento. Dessa forma, foi concluído que o tratamento com mupirocina tópica, lavagens com digluconato de clorexidina, rifampicina oral e doxiciclina por 7 dias foi seguro e eficaz na descolonização por MRSA em pacientes internados por pelo menos 3 meses.

A pneumonia pode ser uma infecção de risco, especialmente em idosos, sendo considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade. Sendo assim, Sumi et al.<sup>115</sup>, em 2007, avaliaram a existência de patógenos orais causadores de doenças respiratórias em idosos dependentes. As placas bacterianas dentárias de 138 idosos, com idade de 65 a 91 anos, foram examinadas para identificar os microrganismos presentes. Depois de coletadas, as amostras foram incubadas a 35 °C por 48 h em condições aeróbicas. Isolados de colônias representativas foram semeados e identificados. Foram considerados colonizados por patógenos respiratórios apenas idosos que apresentaram isolados de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *E. coli*. De acordo com os resultados, uma frequente presença (64,5 %) de patógenos

respiratórios foi verificada na placa dental. Essa prevalência foi considerada 1,5 vezes maior do que aquela observada em biofilmes de próteses. Os patógenos respiratórios predominantes em placa dentária foram *S. aureus* (25,4 %), *K. pneumoniae* (18,1 %), *P. aeruginosa* (18,1 %) e *E. cloacae* (11,6 %). Em biofilmes de próteses, os patógenos respiratórios predominantes foram *E. cloacae* (18 %), *K. pneumoniae* (16 %), *S. aureus* (10 %), *E. coli* (8 %), *H. parainfluenzae* (4 %) e *P. aeruginosa* (2 %). Embora *H. influenzae*, *P. mirabilis* e *S. pneumoniae* não tenham sido detectados em biofilmes de próteses, foram detectados em baixa frequência nas placas dentárias. Segundo os autores, os resultados obtidos podem ser explicados pelo fato de as próteses poderem ser removidas da cavidade oral para ser limpas, enquanto que os dentes são fixos na cavidade oral e podem apresentar cárie dentária e doenças periodontais. Assim, na cavidade oral, os microrganismos podem se proliferar rapidamente. Os resultados do presente estudo revelaram, ainda, que as bactérias que comumente causam infecção respiratória estão presentes nas placas dentárias de idosos dependentes. Portanto, estas placas devem ser consideradas um reservatório específico de colonização em idosos dependentes, podendo contribuir significativamente para o aparecimento da pneumonia aspirativa.

Em 2008, Bassim et al.<sup>13</sup> avaliaram a importância do trabalho de técnicos de higiene oral e os fatores de risco que afetam a incidência de pneumonia em pacientes institucionalizados. Os registros médicos de 143 residentes em um lar de idosos foram analisados. Os pesquisadores fizeram uma análise longitudinal desses registros para investigar a associação entre o trabalho do profissional responsável pela prestação de cuidados de higiene oral

em 2 das 4 alas do lar de idosos (grupo com cuidado oral). As outras 2 alas não receberam a prestação desse serviço (grupo controle). No programa de higiene oral estavam incluídos: a motivação do paciente com relação aos cuidados de higiene oral, a utilização de escovação dental, e o uso de anti-sépticos bucais e de agentes de limpeza de próteses para pacientes parcial ou totalmente desdentados. Foi observado, inicialmente, que o grupo que recebeu cuidados de higiene oral apresentou, aproximadamente, a mesma incidência de mortalidade por pneumonia que o grupo que não recebeu o cuidado oral. Entretanto, quando os dados foram ajustados para os fatores de risco de mortalidade por pneumonia, a probabilidade de óbito por pneumonia no grupo que não recebeu o cuidado oral foi 3 vezes maior do que no grupo que recebeu cuidado oral. Os fatores de risco considerados significativos foram idade, necessidade de ajuda com a alimentação e higiene oral, saúde mental e função cognitiva. Os autores concluíram que a limpeza mecânica regularmente supervisionada ou realizada por um auxiliar de higiene oral pode ser o protocolo de intervenção mais eficaz sugerido para manter a higiene oral dos residentes do lar de idosos e modular a patogênese da pneumonia, tornando, assim, a doença menos virulenta.

O efeito de diferentes soluções desinfetantes sobre a capacidade de remoção de microrganismos foi verificada por da Silva et al.<sup>31</sup>, em 2008. O estudo utilizou soluções desinfetantes de hipoclorito de sódio a 1 %, digluconato de clorexidina a 2 %, glutaraldeído a 2 %, vinagre 100 %, tabletes comerciais de perborato de sódio e perborato de sódio a 3,8 %. Corpos-de-prova de uma resina quimicamente polimerizada foram contaminados *in vitro* por *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* ou *B. subtilis* e submetidos à imersão em uma das soluções desinfetantes por 10 min. Após a imersão, os espécimes foram imersos

por 2 s em água destilada estéril para eliminar o excesso de soluções desinfetantes. Em seguida, foram transferidas para 10 mL de solução salina estéril para a realização das diluições seriadas. Uma alíquota de 0,1 mL dessa suspensão foi plaqueada e incubada por 48 h a 37 °C, para posterior mensuração das ufc/mL residuais. Um experimento separado avaliou o efeito das soluções sobre a rugosidade superficial da resina acrílica. As soluções de hipoclorito de sódio, glutaraldeído e clorexidina foram as mais efetivas contra os microrganismos analisados, seguidas pelo vinagre, perborato de sódio e tabletes comerciais. A rugosidade superficial foi maior após a desinfecção com perborato de sódio e menor após a desinfecção com clorexidina. Hipoclorito de sódio, glutaraldeído, clorexidina, vinagre e perborato de sódio foram considerados alternativas válidas para a desinfecção da resina acrílica.

DeBaun<sup>34</sup>, em 2008, avaliaram as propriedades antimicrobianas da solução de digluconato de clorexidina 2 % sem álcool contra *Acinetobacter baumannii* e MRSA. Para a realização dos experimentos, os autores determinaram, primeiramente, o CIM desta solução e o tempo de morte celular. As cepas foram coletadas do fluxo sanguíneo e tecidos moles infectados de pacientes. A concentração do inóculo preparado foi de, aproximadamente, 10<sup>9</sup>ufc/mL. Foram preparadas e testadas diferentes diluições de solução de clorexidina (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1,024; 1:2,048 e 1:4,096). Para isso, uma alíquota do inóculo foi misturada com cada uma dessas diluições e incubada por 16 a 24 h a 35 °C. A seguir, foi observado o crescimento dos microrganismos por meio da presença de turvação dessa solução. Para determinar o tempo de inibição de crescimento dos microrganismos, as cepas foram preparadas em salina estéril e, em seguida, uma alíquota desse inóculo foi

misturada à solução de clorexidina a 2 % para os intervalos de tempo de 15 s e 1, 3, 6, 9, 12 e 15 min. Os autores observaram que a solução de clorexidina a 2 % sem álcool foi efetiva em um tempo rápido de ação *in vitro* contra as cepas *A. baumannii* e MRSA. A solução testada reduziu o número de colônias em 99 % e, em todos os casos, esta ação antimicrobiana ocorreu no tempo de 3 min de exposição ao produto. O CIM determinado ocorreu em altas diluições do produto testado. Para a *A. baumannii*, a concentração de 1:2 inibiu o crescimento dos microrganismos enquanto que, para o MRSA, as concentrações ficaram acima de 1:8. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que a solução de clorexidina a 2 % sem álcool é um agente antimicrobiano eficaz contra *A. baumannii* e MRSA e oferece proteção adicional ao paciente contra esses microrganismos.

Também em 2008, Klevens et al.<sup>57</sup> relataram que aproximadamente 94.370 novas infecções invasivas e 18.650 mortes foram associadas com MRSA nos Estados Unidos no ano de 2005. A maioria dessas infecções foi adquirida em centros de saúde. Neste artigo, os autores descreveram a história e a epidemiologia do MRSA em centros de saúde e na comunidade e resumiram as estratégias de controle recomendadas na literatura para evitar a transmissão de MRSA. As precauções citadas pelos autores partem do pressuposto que o paciente está contaminado por MRSA e pode transmiti-lo a outros indivíduos. Dentre as precauções citadas, estão: a higienização das mãos antes e depois de ter contato direto com o paciente ou quando deslocar a mão de um local do corpo contaminado para outro não contaminado; utilização de barreiras de proteção individual (como luvas, aventais, máscaras e óculos de proteção); isolamento de pacientes que representam um risco de transmissão

para outras pessoas em salas individuais; procedimentos para adequado manuseio de equipamentos e dispositivos assistenciais que possam estar contaminados com sangue ou fluidos corporais; procedimentos de limpeza diária específicos de superfícies; e utilização de práticas seguras durante a aplicação de injeções. Os autores ressaltaram, ainda, que os cirurgiões dentistas também podem contribuir na informação dos pacientes sobre a prevenção e controle da transmissão de MRSA na comunidade. Com base nos dados apresentados, foi concluído que as precauções de controle de infecção devem ser aplicadas em todos os locais de atendimento à saúde para evitar transmissão de MRSA e outros agentes infecciosos.

Os efeitos colaterais relacionados ao uso de digluconato de clorexidina por pacientes com doença periodontal foram avaliados por McCoy et al.<sup>66</sup>, em 2008. Nesse contexto, foi prescrito tratamento periodontal para os pacientes, incluindo lavagem subgengival com ultrassom e digluconato de clorexidina a 0,12 %, bochecho com 0,12 % de digluconato de clorexidina, 2 vezes ao dia, durante 4 meses, e ingestão de 100 mg de doxicilina por dia, durante 14 dias. Após o período de tratamento, os autores verificaram que 31,4 % dos pacientes relataram efeitos adversos com o uso do digluconato de clorexidina. Os efeitos mais comuns foram alteração no paladar e manchas na língua, dentes e prótese. Feridas na boca, língua e garganta, falta de ar e chiado no peito também foram relatados, porém, com menor frequência. Com base nestes resultados, os autores concluíram que os pacientes que fazem uso do digluconato de clorexidina durante um período prolongado necessitam de uma monitorização cuidadosa. Ainda, foi sugerido que, se efeitos adversos

começarem a se manifestar, o cirurgião dentista deve orientar ao paciente a interromper o uso desse agente para se evitar piores complicações.

A efetividade da irradiação por micro-ondas, em diferentes tempos de exposição, na desinfecção de resinas rígidas de reembasamento foi avaliada por Mima et al.<sup>68</sup>, em 2008. Nesse estudo, 242 corpos-de-prova (10 x 10 x 1 mm) da resina Tokuso Rebase Fast Set foram confeccionados e esterilizados com óxido de etileno. Em seguida, foram individualmente inoculados com os microrganismos testados (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *B. subtilis*) e incubados por 24 h a 37 °C. Para cada microrganismo, 10 corpos-de-prova não foram irradiados (grupo controle) e 50 corpos-de-prova foram irradiados (grupos experimentais). Após o período de incubação, os corpos-de-prova dos grupos experimentais foram imersos em 200 mL de água destilada e irradiados a 650 W por 1, 2, 3, 4 ou 5 min. Os corpos-de-prova do grupo controle foram individualmente imersos em solução salina estéril. Em seguida, alíquotas de 25µL da solução resultante das diluições seriadas de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup> foram semeadas em placas de Petri com meios de cultura seletivos e incubadas por 48 h a 37 °C. As colônias foram quantificadas em ufc/mL. Para verificar a efetividade da desinfecção por micro-ondas em longo prazo, as próteses totais irradiadas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. Oito corpos-de-prova de cada grupo experimental e 4 corpos-de-prova do grupo controle foram submetidos à análise em MEV. Os autores observaram que a irradiação por micro-ondas por 3, 4, e 5 min promoveu a esterilização dos corpos-de-prova contaminados. Após 2 min de irradiação, os corpos-de-prova contaminados com *C. albicans* foram esterilizados, enquanto que os contaminados com bactérias foram desinfetados. Um min de irradiação apresentou crescimento para todos os microrganismos. A análise realizada pelo

MEV indicou alteração na morfologia celular dos espécimes irradiados. Os autores observaram que a efetividade da irradiação por micro-ondas melhorou com o aumento do tempo de exposição e concluíram que a irradiação por 3 min pode ser usada para esterilizar resinas acrílicas.

No mesmo ano, Smith, Hunter<sup>113</sup> avaliaram o efeito de biocidas hospitalares sobre dois patógenos nosocomiais, o MRSA e *P. aeruginosa*, nas formas planctônica e de biofilme. Para isso, discos (1 cm de diâmetro e 1 mm de espessura) de aço inoxidável, teflon e polietileno foram confeccionados, esterilizados, inoculados individualmente e incubados por 24 h a 37 °C sob agitação. Após incubação, os discos foram imersos em 200 µL de três soluções biocidas hospitalares que continham cloreto de benzalcônio (1 %), digluconato de clorexidina (4 %) e triclosan (1 %) e incubados por 24 h a 37 °C. Em seguida, a viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de XTT e do kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability. Os autores observaram que, para as células planctônicas de ambos os microrganismos testados, a concentração mínima bactericida de todos os biocidas foi consideravelmente menor que a concentração de uso recomendada pelos fabricantes. Entretanto, os biocidas na concentração recomendada pelos fabricantes não foram capazes de inativar os microrganismos que estavam na forma de biofilme. Após os tratamentos biocidas, 0 – 11 % das células do biofilme de MRSA e mais de 80 % das células do biofilme de *P. aeruginosa* sobreviveram. Com base nos dados obtidos, os autores concluíram que, embora os biocidas possam ser efetivos contra células planctônicas, biofilmes aderidos a superfícies são mais resistentes às soluções.

Ainda em 2008, Van Strydonck et al.<sup>125</sup> realizaram um estudo avaliando a eficácia do uso da clorexidina durante a escovação no índice de

placa bacteriana e sangramento gengival. Foram selecionados para a pesquisa pacientes sem problemas de saúde e que apresentavam no mínimo 18 dentes naturais. Três grupos de estudo foram obtidos. No primeiro grupo, os pacientes foram instruídos a realizar escovação sem dentífrico, duas vezes ao dia, com uma escova dental contendo um depósito para armazenamento de clorexidina (124 mg do produto em cada escova e a liberação de clorexidina durante a escovação era de aproximadamente 1,3 mg). No segundo grupo (controle), os pacientes realizaram apenas escovação sem dentífrico e clorexidina, duas vezes ao dia. No terceiro grupo, os pacientes realizaram escovação sem dentífrico, duas vezes ao dia, e bochecharam digluconato de clorexidina 0.2 % durante 1 minuto, uma vez ao dia. O estudo teve duração de 6 semanas e os pacientes foram avaliados em três momentos: antes de iniciar o estudo, 3 e 6 semanas após seu início. Os tratamentos instituídos nos 3 grupos de estudo resultaram em redução significativa no índice de placa bacteriana. No terceiro grupo, o índice de placa foi inferior quando comparado aos outros dois grupos e não houve diferença estatística significativa em relação aos índices dos grupos 1 e 2. Em relação ao sangramento gengival, todos os grupos, ao final do tratamento, apresentaram redução do sangramento gengival quando comparados ao início do tratamento. No grupo 3 foi verificado o menor grau de sangramento, não havendo diferença em relação aos grupos 1 e 2. Os autores concluíram que o uso da clorexidina como solução para bochecho pós-escovação resultou em melhora no índice de placa bacteriana e sangramento gengival.

No ano seguinte, Dovigo et al.<sup>38</sup> avaliaram a efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais. Setenta próteses

totais simuladas foram confeccionadas, esterilizadas por óxido de etileno e individualmente inoculadas ( $10^7$  ufc/mL) com *S. aureus* (n=20), *P. aeruginosa* (n=20) e *B. subtilis* (n=30). Após o período de incubação de 24 h a 37 °C, 40 próteses foram transferidas para béqueres contendo 200 mL de água destilada estéril e irradiadas. Para cada microrganismo, 10 próteses foram submetidas à irradiação por micro-ondas a 650 W por 3 min. Além disso, 10 próteses contaminadas com *B. subtilis* foram irradiadas por 5 min. Trinta próteses não irradiadas (n=10 para cada bactéria) foram usadas como controle positivo. Em seguida, alíquotas de 25 µL da solução resultante das diluições seriadas de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  foram semeadas em placas de Petri com meios de cultura seletivos e incubadas por 48 h a 37 °C. As colônias foram quantificadas em ufc/mL. Para verificar a efetividade da desinfecção por micro-ondas em longo prazo, as próteses totais irradiadas foram incubadas a 37 °C por 7 dias em béqueres contendo 200 mL de meio TSB. Os autores observaram que não houve crescimento microbiano nas placas incubadas por 48 h e nos béqueres incubados por 7 dias para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As próteses contaminadas com *B. subtilis* e irradiadas por 3 min demonstraram crescimento microbiano em 6 placas e em todos os béqueres contendo TSB. A irradiação das próteses totais por 5 min contaminadas com *B. subtilis* resultou em crescimento microbiano em 2 placas e 2 béqueres. Com base nos resultados, os autores concluíram que a irradiação por micro-ondas a 650 W por 3 min promoveu a esterilização das próteses totais contaminadas com *S. aureus* e *P. aeruginosa* e que as próteses totais contaminadas com *B. subtilis* foram desinfetadas após a irradiação por micro-ondas a 650 W por 3 e 5 min.

Lee et al.<sup>60</sup>, em 2009, verificaram se os atuais procedimentos de descontaminação química das próteses são suficientes para erradicar MRSA na forma planctônica, de células aderidas e em biofilmes maduros presentes em próteses de resina acrílica. Os agentes testados foram hipoclorito de sódio a 2 %, Perform-ID e Steradent. Primeiramente foi realizado o CIM, definido como a menor concentração do agente que inibiu o crescimento microbiano. Para a realização dos experimentos, discos de resina acrílica autopolimerizável (5 mm de diâmetro) foram contaminados com inóculo bacteriano padronizado de EMRSA-15 ou EMRSA-16 e incubados por 4, 24 e 120 h. A seguir, os discos foram colocados em 1 mL de cada agente testado ou em PBS por intervalos de tempo de 1, 5 ou 10 min. Os espécimes foram transferidos para 1 mL de PBS e centrifugados por 1 min. Foi realizada a diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura específico. Após incubação por 24 h, as colônias foram contadas. Os resultados demonstraram que o hipoclorito a 2 % foi eficaz na eliminação de MRSA nas 3 fases de maturação (4, 24 e 120 h) após um tempo de exposição de 1 min. Para o biofilme de 24 h, o Steradent, no tempo de exposição de 1 min, diminuiu em 16,9 % as células viáveis de EMRSA-15 e no tempo de exposição de 10 min, o resultado foi de 99,7 % para EMRSA-15 e 98,4 % para EMRSA-16. A exposição ao Perform-ID por 1 min, reduziu significativamente o número de células viáveis de biofilmes de 24 h em 99,8 % para EMRSA-16 e 95,1 % para EMRSA-15. Para o biofilme de 120 h, o produto Steradent mostrou não ser efetivo e o Perform-ID, com tempo de exposição de 10 min, mostrou uma redução significativa no número de células viáveis de 99,99 % para EMRSA-15 e 96,83 % para EMRSA-16. Foi concluído que biofilmes de MRSA de 120 h são difíceis de erradicar e que a única solução

efetiva na sua inativação foi o hipoclorito de sódio a 2 %. Além disso, os autores ressaltaram que a erradicação deste organismo em pacientes idosos institucionalizados pode ser significativamente prejudicada se uma possível fonte de reinfecção, como a presença de próteses do próprio paciente, for ignorada ou inadequadamente desinfetada.

Com o objetivo de avaliar os efeitos adversos causados por diferentes agentes de limpeza sobre os materiais para base de próteses, Pinto et al.<sup>90</sup>, em 2009, realizaram um estudo in vitro avaliando hipoclorito de sódio a 1 %, 2 % e 5,25 %, glutaraldeído a 2 % e digluconato de clorexidina a 4 %. Corpos-de-prova circulares foram confeccionados com diferentes resinas acrílicas (Jet, Kooliner e Tokuyama Rebase Fast II) e divididos aleatoriamente em seis grupos de estudo: imersão em água, hipoclorito de sódio a 1 % durante 10 min, hipoclorito de sódio a 2 % durante 5 min, hipoclorito de sódio a 5,25 % durante 5 min, glutaraldeído a 2 % durante 10 min e digluconato de clorexidina a 4 % durante 10 min. Foram realizados 30 ciclos de desinfecção para cada método e a rugosidade superficial e a dureza Knoop foram avaliadas em todos os corpos-de-prova, antes e após os procedimentos. O procedimento de imersão nos diferentes agentes desinfetantes reduziu a dureza de todas as resinas acrílicas avaliadas. Após a simulação de 30 ciclos de desinfecção, houve um aumento significativo da rugosidade superficial da resina Jet, independente do agente de limpeza utilizado. No entanto, a resina Kooliner apresentou uma redução significativa da rugosidade superficial para todos os agentes testados, exceto para o hipoclorito de sódio a 1 %. A resina Tokuyama Rebase Fast II não apresentou alterações de rugosidades após 30 ciclos de desinfecção. Os

autores concluíram que todos os agentes desinfetantes testados apresentaram alteração da dureza e rugosidade das resinas acrílicas.

Em estudo clínico realizado por Ribeiro et al.<sup>93</sup>, em 2009, foi avaliada a efetividade da irradiação por micro-ondas em dois tempos de exposição na desinfecção de próteses totais. Para isso, 30 pacientes portadores de próteses totais foram selecionados e divididos em dois grupos (n=15): grupo 1 – os pacientes tiveram suas próteses irradiadas por 3 min (650 W); grupo 2 – os pacientes tiveram suas próteses irradiadas por 2 min (650 W). Amostras de biofilmes das próteses foram coletadas com swab antes (superfícies do lado esquerdo) e após (superfícies do lado direito) a irradiação por micro-ondas. Todo o material microbiológico foi diluído ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) em solução salina e alíquotas de cada diluição (25  $\mu$ L) foram semeadas em placas de Petri com meios de cultura seletivos para *Candida* spp. (CHROMagar), *Staphylococcus* spp. (Manitol), mutans streptococci (SB20) e em um meio de cultura não-seletivo (Miller Hinton). As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 48 h, exceto para mutans streptococci, que foi incubado em jarros de anaerobiose. As colônias foram quantificadas em ufc/mL. Os microrganismos que cresceram em meios seletivos foram identificados utilizando métodos bioquímicos. Os resultados demonstraram que a irradiação por micro-ondas por 3 min resultou em esterilização de todas as próteses avaliadas. Após a irradiação por micro-ondas por 2 min, uma significativa diminuição para *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., mutans streptococci e espécies não identificadas foi observada. As colônias que cresceram após 2 min de irradiação por micro-ondas foram identificadas como *C. albicans*, *Staphylococcus* não aureus e *S. mutans*. Dessa forma, os autores

afirmaram que a irradiação em micro-ondas por 3 min pode ser um método efetivo na prevenção de contaminação cruzada.

Também em 2009, Sanitá et al.<sup>100</sup> avaliaram a efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais contaminadas com 5 diferentes espécies do microrganismo *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) isoladas de culturas padrão e de pacientes HIV positivo. Para isso, 50 próteses totais superiores simuladas foram confeccionadas, esterilizadas com óxido de etileno e individualmente inoculadas com os microrganismos avaliados. Após o período de incubação de 48 h a 37 °C, as próteses foram transferidas para béqueres contendo 200 mL de água destilada e submetidas à irradiação por micro-ondas a 650 W durante 3 min. As próteses totais não irradiadas foram utilizadas como controle positivo. Em seguida, uma alíquota de 25 µL da solução resultante das diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> foi semeada em placas de Petri e incubada por 48 h a 37 °C. As colônias foram quantificadas em ufc/mL. Para verificar a efetividade da desinfecção por micro-ondas em longo prazo, as próteses totais irradiadas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. Os resultados demonstraram que as próteses totais contaminadas com todas as espécies de *Candida* avaliadas foram esterilizadas após a irradiação por micro-ondas. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a irradiação por micro-ondas durante 3 min a 650 W é um método efetivo para a esterilização de próteses totais contaminadas por diferentes espécies de *Candida* isoladas de pacientes HIV positivo, incluindo aquelas intrinsicamente resistentes a diversos antimicrobianos, como *C. glabrata* e *C. krusei*.

O aumento da resistência aos anti-sépticos do *S. aureus* tem sido considerado um importante problema de saúde global. Dessa maneira, Sheng et al.<sup>104</sup> em 2009, realizaram um estudo avaliando a ação antimicrobiana do digluconato de clorexidina sobre o MRSA. Além disso, os autores avaliaram a resistência do MRSA a esta solução por meio da presença dos genes de resistência (*qacA/B*). Para este estudo, um total de 206 cepas de MRSA foram isoladas de pacientes e identificadas como MRSA. O teste de susceptibilidade do MRSA ao digluconato de clorexidina foi realizado através do método de diluição em ágar. As concentrações do digluconato de clorexidina utilizadas para este experimento foram de 0,125 a 16 µg/mL. A extração do DNA da bactéria foi realizada utilizando uma matriz InstaGene. Uma colônia da bactéria foi suspensa em 1 mL de água destilada e centrifugada durante 1 minuto. Em seguida, o sobrenadante foi removido, 200 µL da matriz InstaGene foram adicionados e foi realizada agitação da mistura por 23 min. O método de detecção do gene *qacA/B* foi feito pelo múltipla reação em cadeia da polimerase. Os autores observaram que 35 % dos isolados utilizados neste estudo apresentaram alta resistência ao digluconato de clorexidina. Os valores de CIM obtidos variaram entre 2 e 8 µg/mL. Entre os 72 isolados de elevada resistência a clorexidina, 67 apresentaram o gene *qacA/B*. Os autores concluíram que é preciso ter cautela na indicação do digluconato de clorexidina como agente anti-séptico, pois como visto neste estudo, microrganismos como o MRSA podem apresentar resistência a este agente.

Basso et al.<sup>15</sup>, em 2010, realizaram um estudo clínico com o objetivo de avaliar o efeito de dois protocolos de desinfecção por micro-ondas (650 W por 3 min) sobre a estabilidade dimensional de próteses totais. Para isso,

40 pacientes foram selecionados, próteses totais superiores foram confeccionadas e submetidas à desinfecção por micro-ondas, tendo sido obtidos dois grupos de estudo (n = 20): irradiação uma vez por semana durante 4 semanas (grupo 1) ou três vezes por semana durante 4 semanas (grupo 2). Em seguida, foram realizadas medições nas próteses totais, em quatro pontos de referência, nos seguintes períodos: antes da primeira desinfecção (controle) e após cada semana de acompanhamento. As próteses foram também avaliadas clinicamente para se verificar a presença de áreas de sobrecompressão, perda de adaptação das próteses ou queixas de pacientes. Os resultados demonstraram que as próteses do grupo 2 apresentaram contração significativamente superior quando comparadas às do grupo 1, em todas os períodos avaliados. Durante o acompanhamento clínico, não foram observadas áreas de sobrecompressão, perda de adaptação das próteses ou queixas de pacientes nas próteses submetidas aos dois protocolos de desinfecção por micro-ondas. Os autores concluíram que os protocolos de irradiação de micro-ondas testados podem ser utilizados com segurança para o tratamento da estomatite protética.

No mesmo ano, Davi et al.<sup>32</sup>, avaliaram a estabilidade de cor, a rugosidade superficial e a resistência à flexão de uma resina acrílica polimerizada em micro-ondas após a imersão durante a noite em hipoclorito de sódio, simulando 180 dias de uso. Quarenta corpos-de-prova de resina acrílica circulares (15 x 4 mm) e 40 retangulares (65 x 10 x 3 mm) foram confeccionados e imersos em hipoclorito de sódio (0,5 e 1 %), Clorox/Calgon e água destilada. As medições de cor ( $\Delta E$ ) foram realizadas por um colorímetro portátil. Um analisador de superfície foi utilizado para medir a rugosidade (mm). A resistência

à flexão (MPa) foi medida utilizando um teste de três pontos em uma máquina de ensaios universal. A análise estatística demonstrou alterações de cor significativamente maiores para o hipoclorito de sódio a 1 %. Ao comparar a rugosidade superficial, não foi encontrada significância estatística entre as soluções. Os corpos-de-prova imersos em hipoclorito de sódio a 1 % apresentaram valores menores de resistência à flexão em relação ao grupo controle. Dessa forma, foi concluído que a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1 % por 8 h, durante o período simulado de 180 dias, influencia a estabilidade de cor e a resistência à flexão de resinas acrílicas polimerizadas por micro-ondas.

Segundo Joshi et al.<sup>54</sup>, em 2010, a busca contínua por novos métodos de desinfecção é essencial para o efetivo controle de infecções. Dessa forma, esses autores avaliaram a eficácia de uma nova técnica de plasma atmosférico não térmico, conhecida como FE-DBD, contra as formas planctônicas e de biofilmes de *E. coli*, *S. aureus* e MRSA (95, USA300 e USA400). Para isso, os autores utilizaram técnicas de quantificação amplamente aceitas, como ensaio de contagem de colônia, ensaio de viabilidade bacteriana (kit LIVE/DEAD BacLight) e ensaio de XTT. Os autores observaram que a exposição das formas planctônicas de *E. coli*, *S. aureus* e MRSA foram rapidamente inativadas pelo plasma. Cerca de  $10^7$  células bacterianas foram totalmente inativadas (100 %), enquanto que  $10^8$  e  $10^9$  foram reduzidas em cerca de 90 % a 95 % e 40 % a 45 %, respectivamente, em menos de 60 s ( $7,8 \text{ J/cm}^2$ ). No biofilme estabelecido, o plasma FE-DBD foi capaz de inativar mais de 60 % de MRSA em 15 s ( $1,95 \text{ J/cm}^2$ ). A inativação das células dependeu do tempo de exposição ao plasma e da densidade celular. O plasma foi capaz de desinfetar

superfícies em menos de 120 s. Dessa forma, foi concluído que a aplicação do plasma pode ser uma técnica de descontaminação valiosa para a remoção de bactérias planctônicas e na forma de biofilme.

Tem sido observado na literatura que a cavidade oral serve como um reservatório para a colonização de microrganismos patogênicos. A prótese, quando instalada no paciente, pode ser contaminada, tanto na superfície interna como na externa, pelos microrganismos presentes na cavidade bucal. Preocupados com isso, Orsi et al.<sup>79</sup>, em 2010, realizaram um estudo avaliando a eficácia de desinfetantes químicos para a desinfecção de resina acrílica. Corpos-de-prova de resina acrílica (Lucitone) foram confeccionados e divididos em 5 grupos experimentais, correspondentes a 5 cepas testadas: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. mutans* e *Enterococcus faecalis*. Cada grupo continha 50 corpos-de-prova, sendo 45 para o grupo experimental e 5 para o grupo controle. Cada corpo-de-prova foi colocado em um tubo de ensaio contendo 15 mL do microrganismo correspondente e incubado por 24 h. Após a contaminação das amostras, o meio de cultura foi retirado do tubo de ensaio e 40 mL das soluções desinfetantes foram adicionados. Soluções de hipoclorito de sódio a 1 % e 2 % e glutaraldeído a 2 % foram testadas. Os corpos-de-prova foram imersos nas soluções desinfetantes por períodos de 5, 10 e 15 min e. Em seguida, os corpos-de-prova foram fraturados e divididos em dois fragmentos para análise da superfície interna da resina. Os fragmentos foram colocados em tubos de ensaio contendo meio de crescimento e incubados por 20 dias. O crescimento microbiano foi avaliado visualmente durante este período. A primeira análise foi feita após 48 h e, a seguir, em intervalos de 72 h. Os resultados mostraram que os desinfetantes utilizados foram efetivos e que não

ocorreu crescimento microbiano antes dos corpos-de-prova serem divididos em fragmentos. Na avaliação seguinte, após a fratura dos corpos-de-prova, observou-se crescimento microbiano. Estes dados garantem que o crescimento microbiano ocorreu após a confecção dos fragmentos, estando assim relacionado à superfície interna da resina acrílica. Entre os microrganismos, o *E. faecalis* foi mais resistente que a *C. albicans* para o hipoclorito de sódio a 2 % durante 5 min. Não houve diferença estatística significativa entre os microrganismos em comparação às outras soluções químicas e os períodos de tempo. Entre as soluções desinfetantes, o glutaraldeído a 2 % foi mais efetivo que o hipoclorito de sódio a 2 % durante 5 min. Em um período de desinfecção por 10 min, não houve diferença estatística entre as soluções desinfetantes. Em relação ao tempo de 15 min de imersão, o hipoclorito de sódio a 1 % e o glutaraldeído a 2 % foram mais efetivos que o hipoclorito de sódio a 2 %. Não houve diferença estatística significativa entre o hipoclorito de sódio a 1 % e o glutaraldeído a 2 %. Todas as soluções desinfetantes reduziram a contaminação microbiana da superfície interna da resina acrílica, mas nenhuma foi capaz de erradicar completamente os microrganismos. De acordo com os dados obtidos no estudo, foi concluído que grande redução da contaminação microbiana da superfície interna da resina acrílica ocorreu quando os corpos-de-prova foram imersos em hipoclorito de sódio a 1 % e glutaraldeído a 2 % durante 15 min.

Semenoff et al.<sup>103</sup>, em 2010, analisaram, em seu estudo in vitro, a ação antimicrobiana de diferentes soluções (clorexidina a 2 %, hipoclorito de sódio a 1 % e paramonoclorofenol associado ao furacin) sobre as cepas de *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* e *P. aereginosa*. Para a realização da fase experimental, placas de Petri contendo meio de crescimento foram

contaminadas com os diferentes microrganismos. Após 24 h de incubação a 37 °C, discos de papéis absorventes imersos nos diferentes agentes desinfetantes foram posicionados sobre as placas de Petri. Após contato dos discos de 15 h (paramonoclorofenol associado ao furacin); 18 h (hipoclorito de sódio a 1 %) e 21 h (clorexidina a 2 %) com os microrganismos, todas as placas foram incubadas a 37 °C durante sete dias e os halos de inibição formados foram mensurados. Os resultados demonstraram que a clorexidina a 2 % foi significativamente mais efetiva para todas as cepas microbianas em comparação às demais substâncias. O hipoclorito de sódio a 1 % apresentou resultados intermediários e o paramonoclorofenol associado ao furacin obteve os piores resultados. Assim, os autores concluíram que a solução de clorexidina a 2 % apresentou o melhor efeito antimicrobiano contra os diferentes microrganismos avaliados neste estudo.

*Proposição*

### *3 Proposição*

Com base nas informações obtidas da literatura, o objetivo desse estudo in vitro foi avaliar a efetividade de duas soluções desinfetantes e da irradiação por micro-ondas na inativação de biofilmes de MRSA formados em próteses totais simuladas e corpos-de-prova.

*Material e método*

## 4 Material e método

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados os seguintes materiais, instrumentos e aparelhos:

### 4.1 Materiais

1. Água destilada;
2. Acetona a 0,4 mM Qhemis, fabricada por F Maia, Cotia, SP, Brasil. Lote nº 32915;
3. Adesivo Super Bonder, fabricado por Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil;
4. Branco de espanha K-dent, fabricado por Quimidrol, Joinville, SC, Brasil;
5. Cera rosa Wilson nº 7, fabricada por Polidental Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil;
6. Cloreto de sódio, fabricado por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil. Lote nº 114358;
7. Cultura de *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA) proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC number - 33591), Manassas, VA, EUA;
8. Dentes artificiais Vipi Dent Plus, fabricados por Dental Vipi Ltda, Pirassununga, SP, Brasil;
9. Detergente líquido ODD; fabricado por Bombril-Cirio, São Paulo, SP, Brasil;
10. Embalagens para esterilização em óxido de etileno, produzidas por ACECIL – Comércio e Esterilização a Óxido de Etileno Ltda, Campinas, SP, Brasil;
11. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL;

12. Gesso pedra tipo III Herodent; fabricado por Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
13. Gesso pedra tipo IV Herodent; fabricado por Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
14. Isolante indicado para resina acrílica, marca Cel-Lac, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
15. Lixa d'água marca Norton, granulação 0, 120 e 180;
16. Meio de cultura Manitol Salt Agar, produzido por Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA. Cod 7143A. Lote nº 0007-101;
17. Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), produzido por Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA. Cod 7164A. Lote nº 0008-120;
18. Menadiona, produzida por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA. Lote nº 065K0230;
19. Papel celofane;
20. Pedra Pomes Pedra-Rio, fabricada por Orlando Antônio Bussioli, Rio Claro, SP, Brasil;
21. Pontas descartáveis para micropipeta, fabricadas por Axygen Scientific, Union City, CA, EUA;
22. Resina acrílica autopolimerizável Jet; fabricada por Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil;
23. Resina acrílica para base de prótese termopolimerizável Lucitone 550, fabricada por Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil. Lote nº43780;
24. Resina para base de prótese incolor, específica para micro-ondas Vipi Wave, fabricada por VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil. Lote nº 5485;

25. Silicone de condensação para inclusão de consistência pesada Labor Mass, fabricado por Vipi Ind. e Com. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil. Lotes nº. 50560647 e 15681;
26. Silicone para molde RTV 3120, fabricado por Daltomare Ind. e Com. Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil;
27. Sódio cloreto (P. A. A. C. S.), produzido por CAQ - Casa da química Ind. e Com. Ltda, Diadema, SP, Brasil;
28. Solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2 %, importada por Deg Imp. de Produtos Químicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil. Lote nº IFO71025;
29. Solução aquosa de hipoclorito de sódio 1 % Impex, fabricada por Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil. Lote nº 603379-RT;
30. Solução salina divisora de fosfato – PBS (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2) Synth, fabricada por Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil;
31. Vaselina sólida, fabricada por Chemco Ind. e Com. Ltda, Campinas, SP, Brasil;
32. XTT, fabricado por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA. Lote nº 029K1600.

#### **4.2 Instrumentos**

1. Alça de Drigalsky descartável, fabricada por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
2. Alça descartável para inoculação de micro-organismos, Redplast Ind. e Com. de Embalagens Plasticas Ltda., Sarzedo, MG, Brasil;

3. Béquer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
4. Bico de Bunsen;
5. Buril de Le Cron, marca Duflex, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
6. Caneta para retroprojeto, fabricada por Faber Castell, São Carlos, SP, Brasil;
7. Erlenmeyer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;
8. Escova de cerdas pretas e de pano macio;
9. Espátulas de aço nº36 Duflex, fabricadas por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
10. Frasco de vidro com tampa para resina acrílica, fabricado por Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
11. Gral e espátula para gesso;
12. Lamparina a álcool;
13. Micropipeta de 05-50 $\mu$ L, fabricada por Eppendorf, Alemanha;
14. Micropipeta de 100-1000  $\mu$ L, fabricada por Eppendorf, Alemanha;
15. Micropipeta de 20-200  $\mu$ L, fabricada por Eppendorf, Alemanha;
16. Mufla metálica nº 6, fabricada por Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
17. Pincel nº 6, fabricado pela Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
18. Pipeta de vidro de 2 mL, fabricada pela Vidrolabor Indústria e Com. de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil;

19. Pipetador de borracha, produzido por Nalgon Equipamentos Científicos Ltda, Itupeva, SP, Brasil;
20. Placa de cultura TPP com 24 orifícios estéril, embaladas individualmente, fabricada pela TPP, Trasadingen, Suíça;
21. Placas de Petri descartáveis 96 x 21 mm, fabricadas por TPP Techno Plastic Products AG, Suíça;
22. Placas de vidros jateados com óxido de alumínio (com rugosidade de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$ ), fabricadas por Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil;
23. Ponta Maxi-cut, fabricada por Labordental, São Paulo, SP, Brasil;
24. Prensa de bancada, fabricada por VH Equipamentos Médicos e Odontológicos, Araraquara, SP, Brasil;
25. Tesoura ouro reta, fabricada por Golgran Instrumentos Cirúrgicos e Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil;
26. Tubos de ensaio Pyrex nº 9820, fabricados por Petriq;
27. Tubos Falcon de 50 mL, produzido por Corning, NY, EUA.

### **4.3 Equipamentos**

1. Agitador de tubos orbital, fabricado por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil;
2. Agitador de tubos, fabricado por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: A 162. Série: 8187148;
3. Autoclave vertical, fabricada por Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil. Modelo: AV 60. Nº. 6614;

4. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda., São Paulo, SP, Brasil. Modelo: BG 400. Nº. 016450;
5. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: BG 440 N° 1010;
6. Cabina de Segurança Biológica, fabricada por Grupo Veco, Campinas, SP, Brasil. Modelo: Bio Seg Classe II – Tipo A;
7. Centrifuga, fabricada por Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha. Modelo: 5810R;
8. Contador de colônias CP 600 Plus, fabricado por Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil. Modelo: CP-600. nº 919;
9. Espectrofotômetro – Biospectro, produzido por Equipar Ltda., Curitiba, PR, Brasil. Modelo: SP-220;
10. Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: MA 0324. Série: 9819011;
11. Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda., Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: MA 033. Série: 9819;
12. Filtro a vácuo, produzido por Fanem, São Paulo, SP, Brasil. Modelo: 089-CAL;
13. Incubadora de bancada shaker, fabricada por Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil. Modelo: Q816M20;
14. Leitora automática de microplacas de 96 poços, 405-750nm, oito canais, fabricada por Thermoplate, Namshan District, Shenzhen, China. Modelo: TP Reader;
15. Micromotor, fabricado por Kavó do Brasil Ind. e Com. Ltda., Joinville, SC, Brasil;

16. Micro-ondas de dupla emissão de ondas, produzido por Brastemp, Manaus, AM, Brasil. Modelo: Sensor Crisp 38 – DES (Doubled Emission System);
17. Prensa hidráulica PM 2000, fabricada por Vipi Delta, Pirassununga, São Paulo, SP, Brasil;
18. Termopolimerizadora Microprocessada Automática SOLAB, fabricada por SOLAB Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil;
19. Torno para polimento;
20. Turbidímetro, fabricado por Siemens Healthcare Diagnostics Inc., West Sacramento, CA, EUA. Modelo: TurbidityMeter.

#### **4.4 Métodos**

##### **4.4.1 Confeção das próteses totais**

###### *Obtenção de modelos de gesso superiores*

Para obtenção dos modelos de gesso, uma caixa com dimensões de 8,5 x 8,5 cm de largura e 2,5 cm de profundidade foi confeccionada em cera rosa nº 7, onde foi posicionado, na região central, um modelo de latão que simulou um arco superior totalmente desdentado. Sobre este modelo, foi vertido o material de moldagem silicone RTV, em uma proporção catalisador/silicone de 4 mL/100 g, sob vibração leve. Após a polimerização do material (24 h), foi obtida uma matriz de silicone RTV posteriormente utilizada para confecção dos modelos de gesso superiores com forma e dimensões padronizadas (Figura 1).



FIGURA 1 - Matriz de silicone RTV utilizada para confecção de modelos de gesso.

Trinta e seis modelos superiores foram, então, confeccionados em gesso pedra tipo IV, espatulado manualmente, utilizando a proporção água/pó indicada pelo fabricante (22 mL/100 g). O gesso foi vazado sob vibração leve e constante e, após a sua reação de presa (45 min), os modelos foram retirados do molde de silicone RTV e suas bases foram regularizadas com lixas d'água de granulações 120 e 180 (Figura 2).



FIGURA 2 - Modelo de gesso tipo pedra melhorado.

### *Obtenção das próteses totais superiores em cera*

Foi realizado primeiramente o isolamento do modelo de gesso pedra melhorado, com o isolante para resina acrílica Cel-Lac. Sobre este modelo, foi confeccionada uma base de prova com resina acrílica quimicamente ativada e lâminas de cera rosa nº 7. Para isso, a resina acrílica foi manipulada, de acordo com as orientações do fabricante, e acomodada sobre o modelo ao atingir a fase plástica. Os excessos foram recortados com um buril de Le Cron. Após o seu acabamento com ponta Maxi-cut, um rolete foi confeccionado com uma lâmina e meia de cera rosa nº 7 dobrada no sentido longitudinal, em forma de sanfona, com faixas de 1 cm de largura. O acabamento do rolete de cera rosa nº 7 foi realizado com uma espátula nº 36 aquecida. Posteriormente, os dentes artificiais, modelo 2D/30M, cor 66, foram montados e a escultura realizada na seguinte seqüência: enceramento, recorte do colo gengival, delineamento dos sulcos horizontais, esboço das bossas radiculares e acabamento da escultura (Figura 3)<sup>119,124</sup>.



FIGURA 3 - Prótese total encerada sobre o modelo de gesso.

A prótese total encerada, devidamente posicionada sobre o modelo de gesso, foi moldada com silicone RTV para obtenção de uma matriz,

seguindo as mesmas etapas descritas anteriormente para confecção da matriz de modelos de gesso (Figura 4). Dessa forma, as demais próteses superiores em cera foram obtidas utilizando a matriz em silicone RTV. Para isso, os dentes artificiais foram adaptados em suas respectivas lojas na matriz de silicone e posteriormente, uma placa e meia de cera rosa nº 7 liquefeita foi vertida. Em seguida, o modelo de gesso superior foi imediatamente posicionado e mantido sob leve pressão no interior da matriz.



FIGURA 4 - Matriz de silicone RTV utilizada para obtenção das próteses totais.

O conjunto formado pelo modelo, base de prova em cera e dentes artificiais foi removido do molde de RTV, após o resfriamento completo da cera por 30 min. Em seguida, foi realizado o acabamento da escultura com o objetivo de remover porções de cera que estejam recobrimo os dentes artificiais, mantendo-os limpos e livres de qualquer excesso de cera. Além disso, as regiões das bossas e das papilas interdetais foram arredondadas com o auxílio da lâmpada de chama horizontal que também contribuiu para obtenção de uma superfície de cera lisa e brilhante (Figura 5).



FIGURA 5 - Prótese total superior encerada.

### *Inclusão e Prensagem*

Cada prótese total superior encerada foi incluída em mufla metálica nº 6 em três etapas. Inicialmente, a parte inferior da mufla foi isolada com uma fina camada de vaselina sólida e preenchida até a borda superior com gesso pedra, espatulado manualmente na proporção de 30 mL de água/100 g de pó, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a base do modelo de gesso foi isolada com vaselina sólida e o conjunto modelo/prótese encerada foi centralizado na mufla e aprofundado até o nivelamento da base do modelo com a superfície do gesso pedra, de forma que as superfícies oclusais dos dentes ficassem paralelas a base da mufla, evitando deslocamentos dentais durante a prensagem<sup>10</sup>. Após a reação de presa (45 min), o gesso foi isolado com uma fina camada de cera rosa nº 7, como preconizado por Compagnoni et al.<sup>28</sup>.

Em seguida, a segunda etapa de inclusão foi realizada através da acomodação de uma muralha de silicone de condensação de consistência pesada, recobrimdo toda a prótese, desde a superfície dos dentes artificiais até a área correspondente à cera da base da prótese. Para a fixação do silicone à

terceira camada, que também foi composta por gesso pedra tipo III, retenções em forma de “concha” foram confeccionadas com o silicone de condensação, sendo distribuídas por toda a superfície da prótese já recoberta. Passado o tempo de reticulação do silicone e a realização do isolamento do gesso da mufla e do silicone com uma fina camada de vaselina sólida, a contra-mufla foi posicionada e preenchida com a terceira camada de gesso. A seguir, a mufla foi fechada com a tampa, levando ao escoamento de gesso pelos seus orifícios. O conjunto foi mantido em prensa manual<sup>10</sup> até a presa final do gesso (45 min). Após esse período, a mufla foi imersa em água em ebulição por aproximadamente 15 min para a completa plastificação da cera da base de prova e, posteriormente, aberta para a eliminação da cera com água em ebulição e detergente. Após o seu resfriamento, o gesso da mufla e contra-mufla foi isolado com Cel-Lac e a resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550, proporcionada e manipulada de acordo com as recomendações do fabricante (10 mL/21 g), foi acomodada no interior do molde de gesso.

A prensagem da resina acrílica foi realizada em duas etapas (prensagem de prova e prensagem final) em uma prensa hidráulica. Inicialmente, a prensagem de prova foi realizada utilizando uma folha de celofane umedecida, interposta entre a mufla e a contra-mufla<sup>10</sup>. A pressão foi aplicada de forma lenta e gradual até atingir 0,5 tonelada, o que permitiu a acomodação inicial da resina acrílica e escoamento dos excessos. Então, a mufla foi aberta e, em seguida, a tira de celofane removida, sendo os excessos de resina acrílica retirados com o auxílio de um buril de Le Cron. Após este procedimento, a mufla foi novamente fechada e prensada por 30 min com uma carga de 1,25 toneladas. Decorrido esse período, a mufla foi retirada da prensa hidráulica e posicionada em uma

prensa manual, sendo submetida ao ciclo curto de polimerização, proposto pelo fabricante. Para isso, cada prótese total superior foi polimerizada na termopolimerizadora microprocessada automática SOLAB por 90 min a 73 °C, seguida da imersão em água em ebulição (100 °C) por 30 min. Concluída a polimerização, a mufla foi resfriada sobre a bancada por 30 min e imersa em água corrente por 15 min. Após este período, a mufla foi aberta e a prótese demuflada para acabamento e remoção das irregularidades.

#### *Limpeza e polimento das próteses*

O modelo de gesso foi removido da prótese com auxílio de tesoura ouro reta. O acabamento da prótese foi realizado por meio da remoção dos excessos com ponta Maxi-cut. O polimento foi realizado no torno mecânico em duas etapas. Primeiramente, com o torno em baixa rotação, foi utilizada uma escova de cerdas pretas com uma mistura de pedra-pomes e água. Posteriormente, com o torno em alta rotação, uma escova de pano macio banhada com uma mistura pastosa de água com branco de Espanha para conferir o brilho adequado à prótese (Figura 6). Após o polimento, todas as próteses totais foram armazenadas em água destilada por 48 h a 37 °C, seguindo-se as especificações para resinas acrílicas<sup>4,53</sup>.



FIGURA 6 - Prótese total polida.

#### *Esterilização das próteses totais*

Previamente à sua contaminação, as próteses foram esterilizadas, individualmente, em autoclave vertical a 121 °C por 20 min, sendo resfriadas lentamente até atingirem a temperatura ambiente (Figura 7).



FIGURA 7 - Prótese total esterilizada.

#### **4.4.2 Confeção dos corpos-de-prova**

Os corpos-de-prova foram confeccionados dentro de condições assépticas, por um único operador, atuando sobre superfície de papel estéril,

utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis. Todos os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada a 37 °C por 48 h<sup>53</sup>.

Para a presente pesquisa, a resina termopolimerizável Vipi Wave foi utilizada (Figura 8). Os corpos-de-prova foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas contendo cavidades circulares com 10 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade (Figura 9).



FIGURA 8 - Resina acrílica termopolimerizável Vipi Wave utilizada na confecção dos corpos-de-prova.



FIGURA 9 - Matriz metálica utilizada para confecção dos corpos-de-prova em resina acrílica.

Para a confecção dos corpos-de-prova, a resina acrílica foi incluída entre duas placas de vidros jateados com óxido de alumínio, cuja rugosidade de aproximadamente  $3,0\ \mu\text{m}$  simula a rugosidade encontrada na superfície interna de próteses conforme estudo anterior<sup>134</sup>. Inicialmente, a parte inferior da mufla foi isolada e preenchida com gesso sobre o qual foi posicionada uma placa de vidro de forma e tamanho compatíveis com as dimensões da matriz metálica (Figura 10).

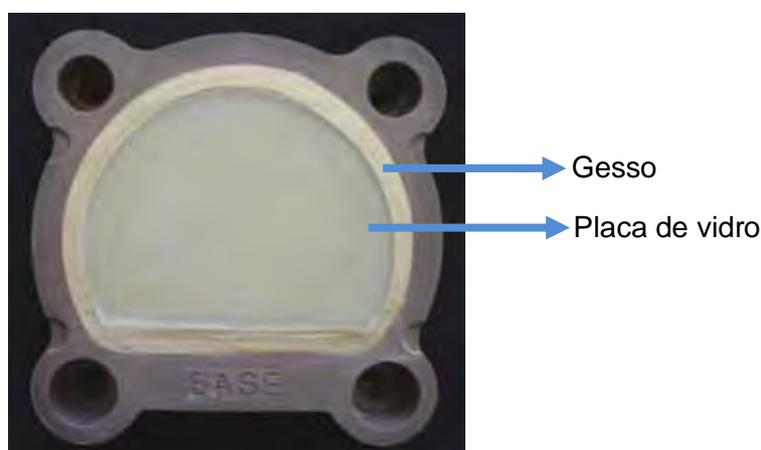


FIGURA 10 - Parte inferior da mufla preenchida com gesso sobre o qual está posicionada a placa de vidro.

Após a presa do gesso, a matriz metálica foi isolada com isolante para gesso em ambos os lados e então fixada com três gotas de adesivo sobre a placa de vidro. A seguir, o silicone de condensação foi manipulado e posicionado ao redor da matriz para facilitar a sua remoção na fase de desinclusão (Figura 11). Outra placa de vidro foi fixada sobre a matriz com cola e a contra-mufla posicionada e preenchida com gesso de maneira convencional.

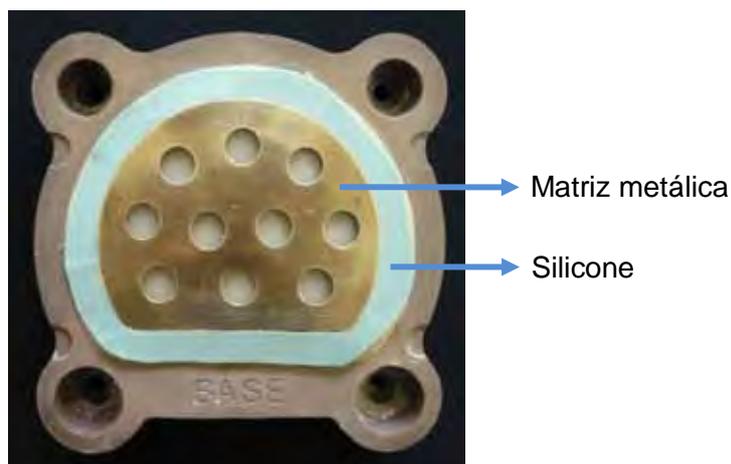


FIGURA 11 - Parte inferior da mufla preenchida com gesso sobre o qual está posicionada placa de vidro e a matriz metálica com silicone ao redor.

Posteriormente à presa do gesso, a mufla foi aberta. A seguir, a resina foi manipulada, de acordo com as instruções do fabricante, onde o pó foi proporcionado em balança de precisão utilizando recipientes esterilizados e o volume de monômero foi dispensado com o auxílio de pipetas de vidro graduadas. Após a mistura, os frascos permaneceram tampados até que a polimerização da resina atingiu a fase plástica. Neste momento, a resina foi inserida nos orifícios da matriz. Em seguida, a mufla foi fechada e o processo de polimerização executado de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (forno de 500 W – 20 min com 20/30 % de Potência + 5 min com 80/100 % de potência). Após o seu resfriamento à temperatura ambiente, a mufla foi aberta e os corpos-de-prova retirados, sendo os excessos laterais removidos com o auxílio de uma ponta estéril Maxi-Cut (Figura 12).



FIGURA 12 - Corpos-de-prova em resina acrílica após o acabamento.

Considerando suas menores dimensões, os corpos-de-prova foram esterilizados por meio de óxido de etileno (ACECIL – Central de Esterilização e Ind. Ltda., Campinas, São Paulo – Brasil) (Figura 13). Este procedimento foi selecionado por ser considerado eficiente e seguro para a esterilização de polímeros<sup>61</sup>. É importante ressaltar que esses corpos-de-prova foram manipulados somente 15 dias após a esterilização, uma vez que um período inferior poderia invalidar os resultados por não haver crescimento microbiológico nesta fase.



FIGURA 13 - Corpo-de-prova esterilizado.

#### 4.4.3 Preparo dos materiais microbiológicos

##### *Preparo de soluções e meios de cultura*

O meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) foi preparado para a inoculação dos microrganismos e para a contaminação e a incubação das próteses totais e corpos-de-prova<sup>38,68,74,105</sup>. O meio de cultura TSB foi proporcionado, manipulado e esterilizado segundo as recomendações do fabricante. Esse meio de cultura constitui-se de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de microrganismos, incluindo a espécie testada neste estudo. Para o preparo do meio, foi utilizada uma proporção de 30g de pó para 1 L de água destilada. Após o preparo do meio de cultura, para a inoculação dos microrganismos, uma alíquota de 10 mL foi pipetada e dispensada em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram tampados com algodão e devidamente identificados e datados. Para a contaminação e a incubação das próteses totais, 200 mL do meio de cultura foram dispensados em béquer de 600 mL, os quais foram posteriormente cobertos com papel alumínio, identificados e datados. Para a contaminação e a incubação dos corpos-de-prova, 200 mL do meio de cultura foram dispensados em erlenmeyer, os quais foram posteriormente cobertos com papel alumínio, identificados e datados. Tubos de ensaio, béqueres e erlenmeyers foram, então, levados em autoclave vertical para esterilização a 121 °C por 20 min. Após esse procedimento, eles foram resfriados, lentamente, até atingirem a temperatura ambiente, e armazenados em refrigerador a 5 °C até a sua utilização nos procedimentos experimentais.

A solução salina utilizada nas diluições seriadas foi preparada pela diluição completa de 8,5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada.

Após a dissolução, 4,5 mL da solução salina resultante, na concentração de 0,15 mol, foram distribuídos em tubos de ensaio e 200 mL foram dispensados em béquer de 600 mL. A seguir, os tubos tampados com algodão e os béqueres cobertos com papel alumínio foram levados em autoclave vertical para esterilização a 121 °C por 20 min e resfriados lentamente até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, foram armazenados em refrigerador a 5 °C até a utilização nos procedimentos experimentais.

O meio de cultura selecionado para a semeadura das placas de Petri foi Manitol Salt Agar<sup>38,68,74,105</sup>. Esse meio de cultura foi proporcionado, manipulado e esterilizado segundo as recomendações do fabricante. Para o preparo do meio, foi utilizada uma proporção de 111 g de pó para 1 L de água destilada. Após o seu preparo, uma alíquota de 20 mL da solução resultante foi pipetada e dispensada em tubos de ensaio devidamente identificados, datados e tampados com algodão. Em seguida, os tubos foram levados à autoclave vertical para esterilização a 121 °C por 20 min. Cada meio de cultura, ainda na fase líquida, foi vertido em placas de Petri descartáveis. As placas de Petri foram, individualmente, fechadas e mantidas na câmara de fluxo laminar até a solidificação do meio de cultura, sendo, então, devidamente identificadas, datadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h. Estes procedimentos foram realizados com o objetivo de verificar a esterilização das placas de Petri e do meio de cultura. Após a incubação, foram descartadas deste estudo todas as placas que apresentaram quaisquer indícios de crescimento microbiano. A seguir, a parte inferior de cada placa de Petri foi externamente dividida em quadrantes com o auxílio de caneta retroprojeter, facilitando, posteriormente, os procedimentos de semeadura dos microrganismos (diluição

seriada por quadrante). Finalmente, as placas de Petri foram armazenadas em refrigerador a 5 °C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura dos microrganismos.

Para a lavagem dos corpos-de-prova, foi utilizada a solução salina divisora de fosfato – PBS (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2)<sup>54,106</sup>. Para a sua obtenção, foram preparadas duas soluções (A e B). Para o preparo da solução A, foi utilizada uma proporção de 4 g de NaCl, 0,12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1g de KCl para 250 mL de água destilada. Para o preparo da solução B, uma proporção de 0,72 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para 250 mL de água destilada foi utilizada. A seguir, as soluções foram esterilizadas no interior de béqueres em autoclave vertical a 121 °C por 20 min e resfriadas, lentamente, até atingirem a temperatura ambiente. Após o resfriamento, as soluções foram misturadas em um béquer de 600 mL, o qual foi coberto com papel alumínio, identificado e datado.

Para a realização dos ensaios de redução de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) nos corpos-de-prova, foram utilizadas solução de PBS 200 mM, solução de XTT e solução de menadiona<sup>54,84,88,106</sup>. Para o preparo da solução de PBS 200 mM, as soluções A e B foram obtidas como descrito anteriormente. Após sua esterilização, 18 g de glicose foram adicionados á solução A, que foi filtrada a vácuo e misturada à solução B em um béquer de 600 mL. A seguir, esse béquer foi também coberto com papel alumínio, identificado e datado. A solução de XTT foi preparada por meio da mistura de água ultra pura com pó de XTT a uma concentração de 1 mg/mL. Essa mistura foi filtrada a vácuo e dispensada em tubo Falcon de 20 mL, o qual foi mantido a - 70 °C até o momento da realização

do experimento. A solução de menadiona foi preparada pela mistura de 0,007g de pó de menadiona em 1 mL de acetona a 0,4 mM. A solução resultante foi vertida em tubo eppendorf e submetida a um procedimento de diluição seriada até  $10^{-2}$ . Esta solução foi preparada imediatamente antes de cada experimento e foi utilizada a diluição seriada de  $10^{-2}$ .

#### *Preparo do inóculo de MRSA*

O microrganismo selecionado para a realização deste experimento (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina – MRSA) foi obtido junto à American Type Culture Collection (ATCC 33591) e ficou congelado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  em TSB e estocado até o momento de sua utilização. Previamente à contaminação das próteses totais e dos corpos-de-prova, o microrganismo foi semeado em placas de Petri sobre o meio de cultura Manitol Salt Agar e incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h. A seguir, uma alçada do microrganismo foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL meio de cultura TSB e incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite<sup>38,68,105</sup>.

Para o preparo da suspensão de contaminação das próteses totais, uma alíquota de 1,5 mL do inóculo em TSB foi transferida para um eppendorf estéril, o qual foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min. O meio de cultura sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) ressuspensas em 5mL de solução salina estéril. Em seguida, o eppendorf foi agitado novamente por 30s, os mesmos passos de centrifugação foram repetidos duas vezes e as células foram, então, ressuspensas em 1,0 mL solução salina estéril. Um turbidímetro foi utilizado para a obtenção de inóculo na concentração aproximada de  $10^7$  ufc/mL<sup>38,68,74,105</sup>. Para isso, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão

de células foram gradativamente adicionadas a um tubo de ensaio contendo 10 mL de TSB até ser obtido um valor no intervalo de 0.06 – 0.10 no display do turbidímetro, correspondendo ao grau de turvação 0.5 da escala de McFarland.

Para o preparo da suspensão de contaminação dos corpos-de-prova, uma alíquota de 1,5 mL do inóculo em TSB foi transferida para um eppendorf estéril, o qual foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min e as células sedimentadas foram lavadas duas vezes com solução PBS estéril por meio de agitação e centrifugação. As células lavadas foram ressuspensas em 20 mL de TSB estéril e a densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada em uma concentração aproximada de  $10^7$  ufc/mL<sup>38,68,74,105</sup>, utilizando-se espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm.

#### **4.4.4 Procedimentos de formação de biofilme nas próteses e corpos-de-prova**

Para a formação de biofilme, as próteses totais foram imersas em béqueres contendo 200 mL de TSB estéril e contaminadas com uma alíquota de 100 µL do microrganismo na concentração anteriormente obtida. Os béqueres foram incubados sob agitação a 80 rpm a 37 °C por 24 h (Figura 14)<sup>38,105</sup>.



FIGURA 14 - Prótese total contaminada após 24 h de incubação a 37 °C.

Para o desenvolvimento de biofilme de MRSA nos corpos-de-prova, a contaminação foi realizada em placas de cultura pré-estéreis de 24 orifícios. Uma alíquota de 2 mL da suspensão celular ( $10^7$  ufc/mL) foi transferida para cada orifício contendo um corpo-de-prova e a placa de cultura foi incubada a 37 °C sob agitação (75 rpm) por 90 min (fase de adesão)<sup>107</sup>. Após o período de adesão, as amostras foram lavadas cuidadosamente duas vezes com 2 mL solução PBS estéril. Essa lavagem é realizada duas vezes com a função de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos. Em seguida, 2 mL de TSB estéril foram adicionados em cada orifício. As placas foram mantidas a 37 °C sob agitação durante 24 h. Decorrido esse período, os corpos-de-prova foram lavados duas vezes com 2 mL solução PBS estéril. Após a lavagem, 2 mL de TSB estéril foram adicionados em cada orifício e, a seguir, as placas foram mantidas a 37 °C sob agitação durante mais 24 h, completando o período de 48 h de incubação (Figura 15).

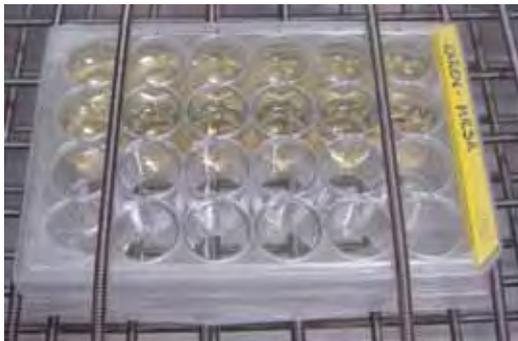


FIGURA 15 - Corpos-de-prova contaminados após 48 h de incubação a 37 °C.

#### 4.4.5 Grupos de estudo

Foram confeccionados 36 próteses totais simuladas e 36 corpos-de-prova. Para cada espécime, 4 grupos de estudo foram obtidos (n=9), com a finalidade de se avaliar a efetividade de duas soluções desinfetantes e um método físico de desinfecção (irradiação por micro-ondas) na redução da viabilidade das células de MRSA. Os quatro grupos de estudo obtidos estão descritos a seguir.

1. Grupo Controle (GC): não foi realizado nenhum método de desinfecção nas próteses totais e nos corpos-de-prova contaminados;
2. Grupo Hipoclorito de sódio 1 % (GH): próteses totais e corpos-de-prova contaminados foram submetidos à imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1 % (Labimpex Indústria e Comércio de Produtos para laboratório Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil) por 10 min;
3. Grupo Digluconato de clorexidina a 2 % (GCI): próteses totais e corpos-de-prova contaminados foram submetidos à imersão em solução de digluconato de clorexidina a 2 % (Deg Importação de produtos químicos Ltda., São Paulo, São Paulo – Brasil) por 10 min;

4. Grupo Irradiação por micro-ondas (GM): próteses totais e corpos-de-prova contaminados foram submetidos à irradiação a 650 W por 3 min em forno de micro-ondas (Brastemp, Manaus, AM, Brasil).

#### **4.4.6 Procedimentos de desinfecção**

- **Grupos Hipoclorito de sódio a 1 %**

Após o período de incubação (24 h), as próteses foram removidas dos béqueres com TSB e individualmente transferidas para outros béqueres contendo 200 mL de solução de hipoclorito de sódio a 1 %, onde ficaram imersas por 10 min. Os corpos-de-prova, após o período de incubação, foram transferidos para outra placa estéril de cultura de células com 24 orifícios contendo, em cada orifício, 2 mL de solução de hipoclorito de sódio a 1 %, onde permaneceram imersos por 10 min.

- **Grupos Digluconato de clorexidina a 2 %**

Após o período de incubação (24 h), as próteses foram removidas dos béqueres com TSB e individualmente transferidas para outros béqueres contendo 200 mL de solução de digluconato de clorexidina a 2 %, onde ficaram imersas por 10 min. Os corpos-de-prova, após o período de incubação, foram transferidos para outra placa estéril de cultura de células com 24 orifícios contendo, em cada orifício, 2 mL solução de digluconato de clorexidina a 2 %, onde permaneceram imersos por 10 min.

- **Irradiação por micro-ondas**

Após o período de incubação, as próteses e os corpos-de-prova foram transferidos individualmente para um béquer contendo 200 mL de água destilada estéril. Em seguida, cada béquer foi posicionado no centro de um prato giratório do forno de micro-ondas (Brastemp, Manaus, AM, Brasil) e irradiado a 650 W por 3 min<sup>38,68,100</sup>. É importante ressaltar que as propriedades mecânicas das resinas acrílicas não são negativamente afetados pela irradiação de micro-ondas por 3 min a 650 W<sup>15,23,93</sup>.

#### **4.4.7 Avaliação da efetividade dos métodos de desinfecção**

##### *Quantificação e contagem do número de colônias viáveis*

As próteses totais do GC foram individualmente transferidas para um béquer contendo 200 mL de solução salina estéril com o objetivo de simular uma imersão, como foi realizado nas próteses desinfetadas. Todas as próteses, tanto as do CG quanto aquelas submetidas aos métodos de desinfecção, foram individualmente transferidas para outro béquer contendo 200 mL de solução salina estéril. Este béquer foi vigorosamente agitado por 1 min em agitador de tubos orbital, deixado em repouso por 9 min e novamente agitado para desprender qualquer célula microbiana da superfície das próteses para a solução resultante. Posteriormente, o processo de diluição seriada foi realizado através da transferência de uma alíquota de 500 µL do béquer com 200 mL de solução salina para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL da mesma solução. O tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos por 1 min e uma nova alíquota de 500 µL foi removida e colocada em outro tubo de ensaio contendo 4,5 mL dessa solução. Esse procedimento foi realizado seis vezes para cada

prótese total do CG e, desta forma, as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  foram obtidas<sup>38,68,74,105</sup>. Uma alíquota de 25  $\mu$ L, das diluições de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ , foi semeada em um dos quadrantes de uma placa de Petri contendo Manitol Salt Agar. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Para as próteses dos grupos GH, GCI e GM, diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foram obtidas e 25 $\mu$ L da solução do béquer com 200 mL de salina e das diluições de  $10^0$  a  $10^{-3}$  foram semeados em uma placa de Petri como descrito anteriormente. É importante enfatizar que todos os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicata. A seguir, todas as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h para verificação do crescimento e contagem das colônias viáveis. Após o período de incubação, todas as placas foram submetidas à contagem de colônias em contador de colônias digital<sup>38,68,74,105</sup>. As placas foram posicionadas sobre o contador de colônia digital e o quadrante que apresentou um valor de número de colônias entre 30 e 300 foi selecionado. A seguir, a ponta do contador foi posicionada individualmente sobre cada uma das colônias formadas para realização da contagem. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foram calculados.

#### *Efetividade da desinfecção em longo prazo*

Para a verificação da efetividade dos métodos de desinfecção em longo prazo, as próteses submetidas à desinfecção foram colocadas individualmente em um béquer contendo 200 mL de meio de cultura estéril TSB, para incubação em estufa bacteriológica a 37 °C por 7 dias<sup>38,68,74,105</sup>. Após esse período, foi observada a presença ou ausência de turvação do meio de cultura.

A presença de leve turvação no meio de cultura indica o crescimento de microrganismos.

#### *Avaliação da viabilidade celular - Ensaio de XTT*

Os biofilmes dos corpos-de-prova foram submetidos ao ensaio de XTT, que avaliou a presença de microrganismos não eliminados por meio da atividade metabólica de células de MRSA<sup>54</sup>. O teste com XTT baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de microrganismos metabolicamente ativos converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em um produto solúvel em água - formazana (cor laranja), o que é mensurado em espectrofotômetro<sup>106</sup>.

Todos os corpos-de-prova, tanto os do CG quanto os desinfetados, foram lavados cuidadosamente duas vezes com 2 mL de solução PBS estéril<sup>54</sup> e transferidos para outra placa com 24 orifícios contendo 2 mL de solução de XTT, composta por PBS a 200 mM de glicose (158 µL), solução de XTT (40 µL) e menadiona (2 µL)<sup>106</sup>. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 h, e após esse período, a solução presente em cada orifício foi homogeneizada com uma pipeta. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um eppendorf e centrifugada a 5000 rpm durante 2 min, para que a células fossem precipitadas. A seguir, 200 µL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidos para o orifício de uma placa de leitura (Elisa). O resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro 492 nm<sup>106</sup> (Figura 16). O experimento foi realizado em três ocasiões distintas, em triplicata.



FIGURA 16 - Produto da degradação do XTT após 3 h de incubação em uma placa de Elisa para leitura em espectrofotômetro.

#### 4.5 Planejamento estatístico

Nesse estudo foram verificadas duas condições experimentais: com e sem desinfecção (grupo experimental e controle, respectivamente). Para cada espécime (próteses totais e corpos-de-prova), 4 grupos de estudo (n=9) foram obtidos. Portanto, no total, 36 próteses totais e 36 corpos-de-prova foram confeccionados para a realização da fase experimental desse estudo.

Para determinar a efetividade dos métodos de desinfecção das próteses totais, foi necessário calcular o número de micro-organismos viáveis, em valores de ufc/mL. Foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Após a obtenção desse valor em cada duplicata, o número de ufc/mL foi calculado. Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

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

q

Nessa fórmula,  $n$  equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 0 a 6) e  $q$  equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (25  $\mu$ L). Os valores de ufc/mL obtidos foram deixados em notação científica e foi obtida então a média aritmética dos valores das duplicatas de cada amostra. Os valores de ufc/mL foram extremamente elevados e variaram muito em relação à média, com distribuição diferente da normal. Dessa forma, foram transformados para logaritmo na base dez ( $\log_{10}$  ufc/mL). Para um método de desinfecção ser considerado efetivo, teria que resultar em uma redução de valor equivalente a três  $\log_{10}$  nos valores de ufc/mL obtidos dos grupos experimentais em comparação àqueles obtidos do grupo controle.

Para determinar a efetividade dos métodos de desinfecção na inativação dos biofilmes desenvolvidos sobre os corpos-de-prova, foi avaliada a atividade metabólica das células de MRSA por meio dos ensaios de XTT. Os valores de densidade ótica (DO) obtidos após leitura da absorbância referentes aos grupos experimentais foram comparados com os valores obtido do grupo controle e as porcentagens de redução (%) foram mensuradas.

Todos os resultados obtidos foram transferidos para uma planilha de um programa de computador (Microsoft Excel 2007) e analisados por estatística descritiva.

*Resultado*

## 5 Resultado

Todas as placas de Petri semeadas correspondentes às próteses não desinfetadas (GC) apresentaram crescimento microbiano após 48 h de incubação (Figura 17). Os valores das médias de  $\log_{10}\text{ufc/mL}$  estão descritos na Tabela 1.



FIGURA 17 - Placas de petri representativa das sementeiras referentes ao GC.

As sementeiras das placas de Petri referentes às próteses desinfetadas dos grupos GCI e GM não apresentaram crescimento microbiano após 48 h de incubação a 37 °C, demonstrando assim, completa desinfecção (Tabela 1). Além disso, após 7 dias de incubação a 37 °C, os resultados demonstraram ausência de crescimento microbiológico nos béqueres de TSB

para as próteses desses dois grupos (Tabela 1), demonstrando também a efetividade destes métodos de desinfecção em longo prazo (Figura 18).

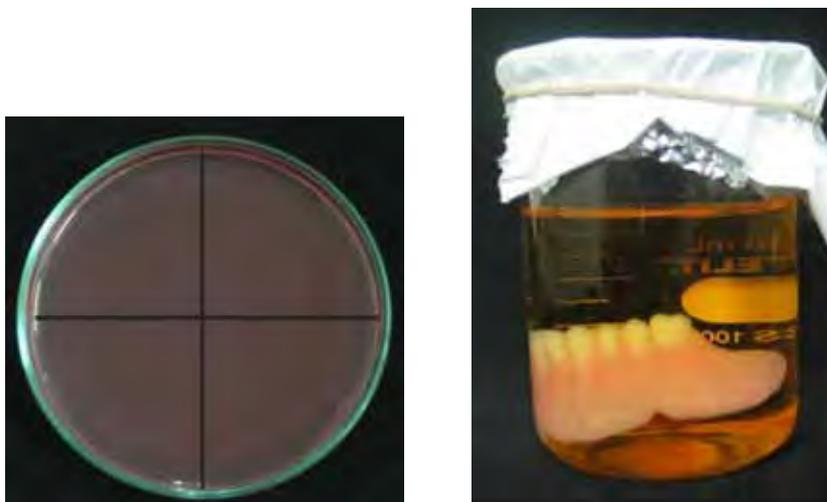


FIGURA 18 - Placa de Petri e béquer representativos das sementeiras das próteses totais referentes aos grupos experimentais GCL e CM.

As placas de Petri semeadas correspondentes às próteses do GH não apresentaram crescimento microbiano após 48 h de incubação, demonstrando efetiva desinfecção (Tabela 1). No entanto, os resultados evidenciaram crescimento microbiológico (Tabela 1) nos béqueres de TSB para as próteses do GH após 7 dias de incubação a 37 °C (Figura 19), demonstrando que esse método de desinfecção não foi efetivo em longo prazo.



FIGURA 19 - Béquer representativo das sementeiras das próteses totais referentes ao grupo experimental GH, após 7 dias de incubação.

Tabela 1 - Media de  $\log_{10}$ ufc/mL para as próteses do grupo controle e grupos experimentais

Grupo	$\log_{10}$ ufc/mL (DP)
GC	6,24 (0,24)
GH	0,00 (0,00)*
GCI	0,00 (0,00)
GM	0,00 (0,00)

DP: desvio padrão

\*Turvou após 7 dias de incubação

Os valores de DO resultantes do ensaio de XTT realizado nos corpos-de-prova estão descritos na Tabela 2. O GC demonstrou coloração alaranjada da solução, evidenciando a atividade metabólica de microrganismos presentes (Figura 20). Nos grupos experimentais, não houve alteração na cor da solução, evidenciando assim a ausência de atividade metabólica celular. Dessa forma, os resultados demonstraram que os métodos de desinfecção testados

resultaram em 100 % de redução na viabilidade celular do biofilme de MRSA, apresentando, portanto, efetiva desinfecção.

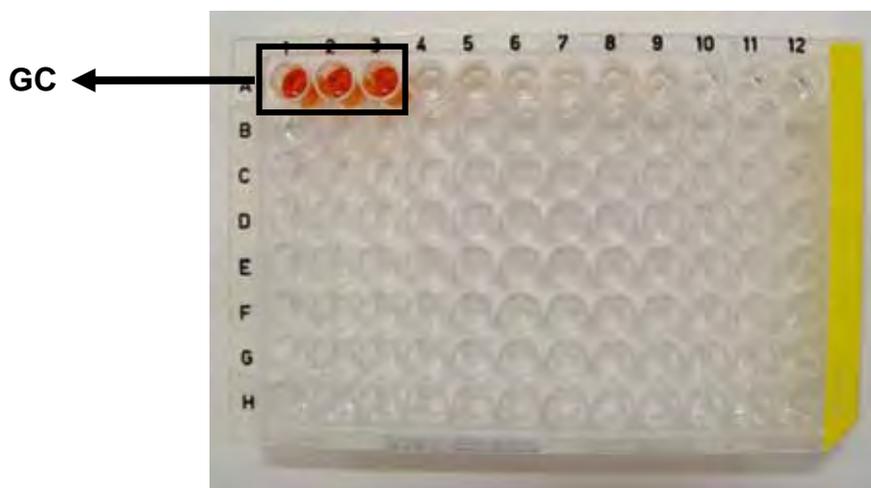


FIGURA 20 - Placa ilustrativa do ensaio de XTT referente a corpos-de-prova do CG.

Tabela 2 - Médias dos valores de absorbância (DO) e porcentagem de redução (%) para os corpos-de-prova do grupo controle e grupos experimentais

Grupo	DO (DP)	%
GC	1,58 (0,27)	-
GH	0	100
GCI	0	100
GM	0	100

DP: desvio padrão

*Discussão*

## 6 Discussão

Considerando uma das principais causas de infecção hospitalar, o MRSA tem sido apontado como um problema mundial de saúde pública<sup>30</sup>. Um estudo de prevalência verificou que, em geral, um em cada 6 pacientes em UTIs inglesas estão colonizados ou infectados por MRSA<sup>47</sup>. Dentre as infecções sistêmicas causadas por *S. aureus*, a pneumonia aspirativa tem sido considerada uma das mais preocupantes<sup>122</sup> por ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente em idosos dependentes<sup>109</sup>. Considerando que estes microrganismos têm sido isolados de cavidade oral de usuários de próteses<sup>52</sup>, o presente estudo comparou a eficácia de diferentes métodos de desinfecção de próteses totais e corpos-de-prova contaminados com MRSA. Os resultados do presente estudo demonstraram que todas as próteses e corpos-de-prova dos GC contaminados com MRSA apresentaram crescimento microbiano após incubação a 37 °C por 24 e 48 h, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram a capacidade do MRSA em se aderir e desenvolver na forma de biofilme em superfícies acrílicas<sup>52,60,97</sup>. A adesão dos microrganismos a diferentes substratos tem sido considerada como o primeiro passo para a formação de biofilme, definido como uma comunidade de células envolta por uma matriz polimérica de substâncias extracelulares. A relevância da formação desses biofilmes está relacionada ao fato de que o comportamento e a suscetibilidade dos microrganismos se alteram durante o processo de desenvolvimento do biofilme<sup>59</sup>, o que resulta em consequências importantes para o tratamento dos pacientes. Estudos anteriores demonstraram que células planctônicas de MRSA foram rapidamente

erradicadas por diferentes agentes antimicrobianos<sup>34,60,63,113</sup>, enquanto que biofilmes de MRSA se mostraram menos suscetíveis a esses agentes<sup>60,113</sup>. Tem sido sugerido que as células presentes nos biofilmes são menos suscetíveis aos agentes antimicrobianos devido ao seu arranjo espacial e a proteção física oferecida pela matriz de polissacarídeos<sup>113</sup>. Dessa maneira, os microrganismos na forma de biofilme, como a placa bacteriana, tendem a ser menos suscetíveis a uma grande variedade de agentes antimicrobianos<sup>60</sup>. Além disso, um outro estudo demonstrou que agentes de higienização de próteses dentárias não foram efetivos na eliminação de MRSA presentes em próteses<sup>112</sup>. Isso pode ter sido causado pelo fato de que o MRSA se apresenta no interior de biofilmes complexos aderidos à superfície das próteses<sup>63</sup>. Dessa forma, torna-se evidente que o desenvolvimento de biofilmes por MRSA deve ser considerado um fator de virulência fundamental deste microrganismo e que resulta em elevado impacto, tanto na patogenicidade quanto no tratamento das infecções por MRSA.

Considerando os resultados obtidos pelos métodos de desinfecção, o presente estudo constatou que a irradiação por micro-ondas a 650 W por 3 min resultou em desinfecção completa de todas as próteses totais e corpos-de-prova contaminados com MRSA. Esse método de desinfecção tem se mostrado efetivo contra diversos microrganismos, incluindo alguns vírus<sup>95</sup>, diferentes espécies de *Candida*<sup>38,68,93,100,105</sup>, *P. aeruginosa*<sup>105</sup> e *B. subtilis*<sup>38,68,105</sup>. Além disso, os resultados deste estudo estão de acordo com estudos prévios que verificaram que a irradiação por micro-ondas foi efetiva na desinfecção e até mesmo na esterilização de próteses dentárias<sup>9,38,93,95,100,105</sup>. O efeito da irradiação por micro-ondas na erradicação de MSSA de próteses dentárias também foi demonstrado em estudos *in vitro*<sup>38,68,105</sup> e *in vivo*<sup>93</sup>. No entanto, este é o primeiro

estudo relatando a eficácia deste método físico de desinfecção na erradicação de MRSA. Em alguns dos estudos relatados que utilizaram a exposição às micro-ondas como método de desinfecção, a irradiação foi realizada a seco<sup>9,95</sup>. Entretanto, a efetividade da ação das micro-ondas parece estar relacionada à imersão em água das amostras contaminadas durante a irradiação. No experimento de Rohrer, Bulard<sup>95</sup>, os microrganismos presentes nas próteses foram eliminados somente após 8 ou 10 min de irradiação a 720 W, possivelmente, devido à irradiação ter sido realizada a seco. Outro estudo<sup>36</sup> observou que a imersão em água de amostras de resinas para base de próteses, contaminadas com *C. albicans*, durante a exposição às micro-ondas por 5 min em potência máxima, resultou em sua esterilização, enquanto que a irradiação destas amostras a seco, pelo mesmo tempo e potência descritos, resultou somente em sua desinfecção. Da mesma forma, outros estudos in vitro utilizaram o protocolo de irradiação de 3 min a 650 W e verificaram completa esterilização de próteses totais e corpos-de-prova, contaminados com diversos microrganismos e imersos em água<sup>68,74,100,105</sup>.

Apesar de vários estudos evidenciarem a ação letal das micro-ondas sobre os microrganismos<sup>23,74,95,105</sup>, os mecanismos pelos quais as micro-ondas promovem a sua inativação não estão bem estabelecidos. Alguns autores<sup>17,44,78,95</sup> atribuem o efeito letal da irradiação sobre a atividade metabólica de diferentes microrganismos ao calor gerado pelas micro-ondas (efeitos térmicos). Entretanto, outros pesquisadores<sup>78,129</sup> acreditam que somente o aumento da temperatura causado pela ação das micro-ondas é insuficiente para explicar sua ação letal, sugerindo a existência de outros efeitos sobre a atividade metabólica dos diferentes microrganismos. Estes efeitos, descritos como não-

térmicos, podem ser considerados uma interação entre o campo eletromagnético das micro-ondas e as moléculas das células, resultando em mecanismos moleculares, mecânicos ou de aquecimento seletivo<sup>78</sup>. Alguns autores<sup>96</sup> acreditam que, quando as micro-ondas entram em contato com materiais contendo água, como as células microbianas, este líquido poderia absorver a radiação, fazendo as células vibrarem, o que causaria um aumento extremo a temperatura celular, alterações morfológicas nas células e sua consequente desintegração. Além disso, dependendo do meio circundante dos microrganismos e da concentração dos compostos iônicos presentes no citoplasma celular, algumas células poderiam ser aquecidas seletivamente pelas micro-ondas, gerando no seu interior uma temperatura maior que no meio circundante<sup>78,129</sup>. Isto poderia explicar, parcialmente, o efeito bactericida da irradiação por micro-ondas<sup>24,78</sup>. Além disso, tem sido sugerido que a energia gerada pelas micro-ondas poderia causar uma oscilação muito rápida da célula microbiana, o que poderia superar o limite elástico da estrutura celular, causando a sua ruptura<sup>24</sup>. Independentemente da natureza da letalidade, um estudo recente demonstrou que a irradiação por micro-ondas de uma suspensão de células fúngicas produziu alterações na sua integridade estrutural, modificando a permeabilidade da membrana celular e seu metabolismo, resultando em morte celular<sup>23</sup>. Provavelmente, a combinação desses mecanismos foi responsável pela alta suscetibilidade do MRSA à irradiação por micro-ondas, como observado pela ausência de crescimento microbiano após 48 h e 7 dias de incubação.

Da mesma forma como observado para a irradiação por micro-ondas, a imersão em digluconato de clorexidina a 2 % por 10 min resultou em

desinfecção completa para todas as próteses totais e corpos-de-prova contaminados com MRSA, após 48 h e 7 dias. Esses resultados estão de acordo com os de outros estudos que observaram a eficácia do digluconato de clorexidina contra diversos microrganismos, como *C. albicans*<sup>31</sup> e uma grande variedade de bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Escherichia* e *Staphylococcus*, incluindo MRSA<sup>31,34,113</sup>. O efetivo protocolo utilizado no presente estudo foi baseado em estudos anteriores, com algumas modificações. Smith, Hunter<sup>113</sup> estabeleceram um protocolo de desinfecção no qual imersão em digluconato de clorexidina a 4 % por 24 h foi efetiva na erradicação de células planctônicas de MRSA. No entanto, essa solução na concentração de 4 % é considerada prejudicial às resinas acrílicas, podendo causar efeitos deletérios sobre a sua dureza e rugosidade superficial<sup>75,90</sup>. Considerando que os efeitos desfavoráveis dos agentes desinfetantes sobre as resinas acrílicas são influenciados pela sua concentração e pelo tempo de exposição utilizado, estudos foram realizados para avaliar a eficiência de concentrações e períodos de exposição menores. Nesse contexto, a imersão em digluconato de clorexidina por 3 e 10 min foi efetiva para erradicar, respectivamente, células planctônicas de MRSA<sup>34</sup> e biofilmes de MSSA<sup>31</sup>. Esses resultados estão de acordo com o que foi verificado no presente estudo, no qual o digluconato de clorexidina a 2 % foi capaz de erradicar completamente biofilmes de 24 h (próteses totais) e 48 h (corpos-de-prova) de MRSA, após 10 min de exposição. Diferentemente da irradiação por micro-ondas, a solução de digluconato de clorexidina é um método químico de desinfecção com outros mecanismos de ação. As moléculas de carga positiva dessa solução se aderem à carga negativa da parede celular das bactérias, principalmente aos grupos

fosfato nos lipopolissacarídeos e carboxilas, causando precipitação de proteínas da parede celular, coagulação do citoplasma e a perda de componentes intracelulares de baixo peso molecular<sup>103</sup>. Assim, o digluconato de clorexidina pode atuar como um agente bacteriostático em baixas concentrações e bactericida em altas concentrações<sup>103</sup>. Apesar de sua ação efetiva contra MRSA, tem sido observado que um aumento na intensidade de uso do digluconato de clorexidina e na prevalência de MRSA pode estar relacionado ao aparecimento de cepas resistentes a anti-sépticos<sup>104</sup>. A resistência do MRSA por diferentes soluções anti-sépticas, incluindo digluconato de clorexidina, é conferida por duas famílias de genes, *qacA* e *qacB*<sup>104</sup>. Os genes *qacA/B* codificam uma proteína de efluxo de prótons, que confere um alto nível de resistência a algumas cepas. Sheng et al.<sup>104</sup> relataram a existência de uma quantidade significativa de MRSA portadores desses genes de resistência à clorexidina, o que pode estar relacionado ao aumento da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CIM e CBM) desse microrganismo contra vários agentes antimicrobianos<sup>104</sup>. Dessa maneira, considerando que no presente estudo não foi realizada uma análise genética da cepa ATCC de MRSA testada, os resultados obtidos para o digluconato de clorexidina a 2 % nesta investigação devem ser interpretados de forma cautelosa.

A solução de hipoclorito de sódio tem sido amplamente utilizada na odontologia como agente de limpeza de próteses, pois, além de ser bactericida e fungicida<sup>17-18,31,51,60,79</sup>, tem a capacidade de dissolver mucina e outras substâncias orgânicas<sup>21</sup>. Tem sido relatado que o mecanismo de ação do hipoclorito de sódio está relacionado a uma ação direta da solução sobre a matriz orgânica do biofilme, causando a dissolução da estrutura polimérica<sup>11</sup>. As

características físico-químicas do hipoclorito de sódio também têm sido apontadas como responsáveis pelo seu efeito antimicrobiano. O hipoclorito de sódio é uma base forte ( $\text{pH} > 11$ ) e seu pH elevado altera a integridade da membrana citoplasmática através da degradação de fosfolípidios ou ácidos graxos insaturados ou por meio de injúrias aos componentes orgânicos e transporte de nutrientes. Esta reação causa uma inibição enzimática irreversível e alterações no metabolismo celular, resultando em morte celular<sup>42</sup>. Um estudo<sup>18</sup> demonstrou que células planctônicas de MSSA são rapidamente eliminadas (4 min) quando imersas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,5 %. Em testes de suscetibilidade do MRSA, o hipoclorito de sódio apresentou uma concentração inibitória mínima de 0,03 %<sup>60</sup>. No entanto, maiores concentrações ou tempos de exposição são necessários para inativar biofilme de *S. aureus*, uma vez que estes foram menos suscetíveis a este desinfetante quando em comparação à forma planctônica de células. No presente estudo, a imersão em hipoclorito de sódio a 1 % por 10 min foi efetiva na desinfecção em curto prazo (48 h) das próteses totais e corpos-de-prova contaminados com biofilmes de 24 e 48 h de MRSA, respectivamente. Em um estudo anterior, um protocolo semelhante (imersão em hipoclorito de sódio a 1 % por 15 min) também foi capaz de inativar biofilme de *S. aureus* cultivado em resina acrílica de base de prótese<sup>79</sup>. No entanto, apesar da desinfecção em curto prazo, o presente estudo observou crescimento microbiano após incubação por 7 dias em todos os béqueres contendo as próteses desinfetadas, demonstrando que 10 min de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1 % não foi efetivo na desinfecção em longo prazo das próteses. Da mesma forma, da Silva et al.<sup>31</sup> verificaram, embora em pequeno número, a permanência de células viáveis de

*S. aureus* em superfícies acrílicas após imersão em hipoclorito de sódio a 1 % por 10 min. A relevância clínica deste fato é que as células sobreviventes de MRSA têm a capacidade de reativar o biofilme, sustentar uma fonte de contaminação e, conseqüentemente, dar origem a uma infecção persistente<sup>97,113</sup>. Assim, concentrações mais elevadas, provavelmente, devem ser necessárias para erradicar completamente o MRSA, eliminando a possibilidade de sua recorrência. Tem sido demonstrado que, para a inativação de biofilmes de MRSA, um menor tempo de imersão (1 min) foi efetivo quando a concentração de hipoclorito de sódio foi elevada para 2 %<sup>60</sup>. No entanto, a eficácia desse protocolo em longo prazo ainda precisa ser demonstrada.

Apesar de todos os métodos de desinfecção testados no presente estudo terem sido eficientes na redução da colonização de próteses e corpos-de-prova por MRSA, a desinfecção por micro-ondas apresenta algumas vantagens sobre as soluções desinfetantes. A utilização de digluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio para imersão tem sido desestimulada devido a seus possíveis efeitos deletérios sobre os materiais da prótese<sup>7,14,17,21,32,75,90</sup>. A solução de digluconato de clorexidina tem sido associada à descoloração de dentes artificiais<sup>14</sup>, enquanto o hipoclorito de sódio pode provocar o branqueamento da resina acrílica, corrosão de componentes metálicos<sup>7,21</sup> e alterações na resistência à flexão<sup>32</sup> e dureza<sup>75,90</sup> de resinas acrílicas de base de prótese. Neppelenbroek et al.<sup>74</sup> observaram que as soluções desinfetantes podem influenciar a matriz polimérica intersticial, sendo que o grau de influência é dependente da duração da imersão e do tipo do desinfetante usado. Os autores observaram também que as soluções desinfetantes (digluconato de clorexidina a 4 %, hipoclorito de sódio a 1 % e perborato de sódio a 3,78 %) promoveram uma

discreta redução na dureza de resinas acrílicas para base de próteses. Outros inconvenientes destas soluções químicas estão relacionados aos seus efeitos colaterais, que podem prejudicar a cooperação dos pacientes. Sabor desagradável<sup>14</sup>, descoloração da língua<sup>125</sup> e dentes naturais<sup>14,16</sup> e alteração no paladar<sup>66</sup> têm sido relatados após o uso do digluconato de clorexidina. Outros efeitos adversos desta solução, como aparecimento de lesões na língua e/ou garganta, falta de ar, congestão nasal, diarreia, náusea, queimação e sensibilidade gástrica, dor abdominal e lesões de pele, também foram verificados<sup>66</sup>. Além disso, é importante ressaltar que o uso descontrolado do digluconato de clorexidina tem resultado no aparecimento de cepas de MRSA resistentes a este agente antimicrobiano<sup>104</sup>, o que talvez seja sua maior desvantagem. A solução de hipoclorito de sódio também apresenta desvantagens relacionadas a seu odor e sabor desagradáveis<sup>17</sup> e, em soluções mais concentradas, este agente pode ser menos biocompatível<sup>42</sup>.

Considerando os aspectos anteriormente discutidos, a irradiação por micro-ondas é uma alternativa viável para evitar os inconvenientes e efeitos nocivos das soluções desinfetantes. Embora as propriedades dos materiais de prótese não terem sido avaliadas neste estudo, tem sido demonstrado que as propriedades mecânicas de resinas acrílicas não são afetadas negativamente pela irradiação por micro-ondas por 3 min a 650 W<sup>15,23,93</sup>. Um estudo recente demonstrou também que este regime de micro-ondas melhorou significativamente a adaptação das bases de próteses totais<sup>29</sup>. Além disso, por ser um método físico de desinfecção, o surgimento de microrganismos resistentes podem ser evitados com o uso da irradiação por micro-ondas. Dessa forma, a irradiação por micro-ondas das próteses dentárias pode ser apontada

como um método de desinfecção simples, rápido, seguro, efetivo e de baixo custo para a erradicação de MRSA das próteses dentárias. Além disso, este método de desinfecção pode apresentar uma aplicação clínica relevante em consultórios odontológicos, instituições e hospitais onde pacientes portadores de próteses são tratados, melhorando a longevidade e qualidade de vida destes indivíduos e reduzindo o impacto das infecções causadas por MRSA.

*Conclusão*

## 7 Conclusão

Com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

1. A irradiação por micro-ondas durante 3 min de exposição a 650 W demonstrou desinfecção completa de todas as próteses totais e corpos-de-prova contaminados com biofilme de MRSA, em curto e longo prazo.
2. A imersão em solução de digluconato de clorexidina a 2 % por 10 min demonstrou desinfecção completa de todas as próteses totais e corpos-de-prova contaminados com biofilme de MRSA, em curto e longo prazo.
3. A imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1 % por 10 min demonstrou desinfecção de todas as próteses totais e corpos-de-prova contaminados com biofilme de MRSA, em curto prazo.
4. A desinfecção por micro-ondas e por imersão em digluconato de clorexidina a 2 % são eficientes na inativação de MRSA presente no biofilme de próteses.

*Referências*

## 8 Referências\*

1. Abe S, Ishihara K, Okuda K. Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. Arch Gerontol Geriatr. 2001; 32: 45-55.
2. Abelson DC. Denture plaque and denture cleaners: review of the literature. Gerodontics. 1985; 1: 202-6.
3. Acar JF. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. Clin Infect Dis. 1997; 24: 17-8.
4. American Dental Association. Council on Dental Materials and Devices. Specification n°. 12 for denture base polymers. Chicago; 1999.
5. Atmaca S, Akdag Z, Dasdag S, Celik S. Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. Acta Microbiol Immunol Hung. 1996; 43: 371-8.
6. Azevedo A, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Magnani R. Effect of disinfectants on the hardness and roughness of relined acrylic resins. J Prosthodont. 2006; 15: 235-42.
7. Backenstose WM, Wells JG. Side effects of immersion-type cleansers on the metal components of dentures. J Prosthet Dent. 1977; 37: 615-21.
8. Bagg J, Sweeney MP, Harvey-Wood K, Wiggins A. Possible role of *Staphylococcus aureus* in severe oral mucositis among elderly dehydrated patients. Microb Ecol Health Dis. 1995; 8: 51-6.
9. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. Spec Care Dentist. 2001; 21: 4-8.

---

\*De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site: [HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

10. Barbosa DB, Compagnoni MA, Leles CR. Changes in occlusal vertical dimension in microwave processing of complete dentures. *Braz Dent J.* 2002; 13: 197-200.
11. Barnabé W, Mendonça Neto T, Pimenta FC, Pregoraro LF, Scolaro JM. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J. Oral Rehabil.* 2004; 31: 453-9.
12. Bartlett JG, Gorbach SL, Finegold SM. The bacteriology of aspiration pneumonia. *Am J Med.* 1974; 56: 202-7.
13. Bassim CW, Gibson G, Ward T, Paphides BM, Denucci DJ. Modification of the risk of mortality from pneumonia with oral hygiene care. *J Am Geriatr Soc.* 2008; 56: 1601-7.
14. Bassiouny MA, Grant AA. The toothbrush application of chlorhexidine. A clinical trial. *Br Dent J.* 1975; 139: 323-7.
15. Basso MF, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Compagnoni MA. Influence of microwave disinfection on the linear dimensional stability of complete dentures: a clinical study. *Int J Prosthodont.* 2010; 23: 318-20.
16. Bay LM. Effect of toothbrushing with different concentrations of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis. *J Dent Res.* 1978; 57: 181-5.
17. Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent.* 1998; 79: 454-8.

18. Bell JA, Brockmann SL, Feil P, Sackuvich DA. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. *J Prosthet Dent.* 1989; 61: 580-3.
19. Binkley CJ, Haugh GS, Kitchens DH, Wallace DL, Sessler DI. Oral microbial and respiratory status of persons with mental retardation/intellectual and developmental disability: an observational cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 722-31.
20. Brace ML, Plummer KD. Practical denture disinfection. *J Prosthet Dent.* 1993; 70: 538-40.
21. Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979; 42: 619-23.
22. Buehlmann M, Frei R, Fenner L, Dangel M, Fluckiger U, Widmer AF. Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29: 510-6.
23. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DMP. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses.* 2007; 50: 140-7.
24. Carrol DE, Lopez A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. *J Food Sci.* 1969; 34: 320-4.
25. Chadwick PR. Revised UK guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 1999; 11: 89-91.

26. Chang SC, Hsieh SM, Chen ML, Sheng WH, Chen YC. Oral fusidic acid fails to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and results in emergence of fusidic acid-resistant strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 36: 131-6.
27. Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1995; 74: 309-13.
28. Compagnoni MA, Nogueira SS, Russi S, Lombardo JG, Ferreira PCP. Influência da união prévia dos dentes artificiais na confecção das próteses totais. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1993; 47: 1111-5.
29. Consani RL, Mesquita MF, de Arruda Nobilo MA, Henriques GE. Influence of simulated microwave disinfection on complete denture base adaptation using different flask closure methods. *J Prosthet Dent.* 2007; 97: 173-8.
30. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 53-9.
31. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17: 627-33.
32. Davi LR, Peracini A, Ribeiro Nde Q, Soares RB, da Silva CH, Paranhos Hde F et al. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology.* 2010; 27: 297-302.

33. De Visschere LM, Grooten L, Theuniers G, Vanobbergen JN. Oral hygiene of elderly people in long-term care institutions – a cross-sectional study. *Gerodontology*. 2006; 23: 195-204.
34. DeBaun B. Evaluation of the antimicrobial properties of an alcohol-free 2% chlorhexidine gluconate solution. *AORN J*. 2008; 87: 925-33.
35. Didilescu AC, Skaug N, Marica C, Didilescu C. Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clin Oral Invest*. 2005; 9: 141-7.
36. Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. *J Prosthet Dent*. 1999; 81: 207-14.
37. Doebbeling BN, Breneman DL, Neu HC, Aly R, Yangco BG, Holley HP Jr et al. Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in healthcare workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. *Clin Infect Dis*. 1993; 17: 466-74.
38. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. *J Prosthodont*. 2009; 18: 611-7.
39. Egusa H, Watamoto T, Abe K, Kobayashi M, Kaneda Y, Ashida S et al. An analysis of the persistent presence of opportunistic pathogens on patient-derived dental impressions and gypsum casts. *Int J Prosthodont*. 2008; 21: 62-8.

40. Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL et al. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. Clin Infect Dis. 2003; 36: 592-8.
41. Epstein J, Ransier A, Lunn R, Spinelli J. Enhancing the effect of oral hygiene with the use of a foam brush with chlorhexidine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 77: 242-7.
42. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002; 13: 113-7.
43. Etienne J, Fleurette J, Ninet JF, Favet P, Gruet LD. Staphylococcal endocarditis after dental extraction. Lancet. 1986; 2: 511-2.
44. Fitzpatrick JA, Kwao-Paul J, Massey J. Sterilization of bacteria by means of microwave heating. J Clin Eng. 1978; 3: 44-7.
45. Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Chopin C. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. Crit Care Med. 1998; 26: 301-8.
46. Granton JT, Grossman RF. Community-acquired pneumonia in the elderly patient: clinical features, epidemiology, and treatment. Clin Med. 1993; 14: 537-53.
47. Hails J, Kwaku F, Wilson AP, Bellington G, Singer M. Large variation in MRSA policies, procedures and prevalence in English intensive care units: a questionnaire analysis. Intensive Care Med. 2003; 29: 481-3.

48. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labishinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 199-209.
49. Harbarth S, Dharan S, Liassine N, Herrault P, Auckenthaler R, Pittet D. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial to evaluate the efficacy of mupirocin for eradicating carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1412-6.
50. Hemidal A, Nord CK. Colonization of the oropharynx with pathogenic microorganisms – A potential risk for infection in compromised patients. *Chemotherapia.* 1985; 4: 186- 91.
51. Henderson CW, Schwartz RS, Herbold ET, Mayhew RB. Evaluation of the barrier system, an infection control system for the dental laboratory. *J Prosthet Dent.* 1987; 58: 517-21.
52. Honma K, Tawara Y, Okuda K. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human saliva and on denture surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1994; 35: 217-20.
53. International Organization for Standardization. Specification 1567 for denture base polymers. 2<sup>nd</sup> ed. Switzerland: ISO; 1999.
54. Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control.* 2010; 38: 293-301.

55. Kallen AJ, Wilson CT, Larson RJ. Perioperative intranasal mupirocin for the prevention of surgical-site infections: systematic review of the literature and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005; 26: 916-22.
56. Kim T, Oh PI, Simor AE. The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001; 22: 99-104.
57. Klevens RM, Gorwitz RJ, Collins AS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a primer for dentists. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139: 1328-37.
58. Kralovic SM, Melin-Aldana H, Smith KK, Linnemann CC. *Staphylococcus lugdenensis* endocarditis after tooth extraction. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 715-6.
59. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. The susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53: 383-5.
60. Lee D, Howlett J, Pratten J, Mordan N, McDonald A, Wilson M et al. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 291: 241-6.
61. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1999; 81: 202-6.
62. Lu WP, Sun Y, Bauer MD, Paule S, Koenigs PM, Kraft WG. Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with beta-lactams using electrospray mass spectrometry. *Biochemistry.* 1999; 38: 6537-46.

63. Maeda Y, Kenny F, Coulter WA, Loughrey A, Nagano Y, Goldsmith CE et al. Bactericidal activity of denture-cleaning formulations against planktonic health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Infect Control*. 2007; 35: 619-22.
64. Maraha B, VanHalteren J, Verzijl JM, Wintermans RG, Buiting AG. Decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using oral vancomycin and topical mupirocin. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 671-5.
65. Marsh P, Martin MV. *Oral microbiology*, 4th ed. Oxford, Wright. 1999.
66. McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139: 178-83.
67. Merchant VA. An update on infection control in the dental laboratory. *Quintessence Dent Technol*. 1997; 20: 157-65.
68. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Effect of different exposure times of microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008; 17: 312-7.
69. Muder RR, Boldin M, Brennen C, Hsieh M, Vickers RM, Mitchum K et al. A controlled trial of rifampicin, minocycline, and rifampicin plus minocycline for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term care patients. *J Antimicrob Chemother*. 1994; 34: 189-90.
70. Mylotte J. Nursing home-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2002; 35: 1205-11.

71. National Nosocomial Infections Surveillance. System report, data summary from January 1990-May 1999. *Am J Infect Control.* 1999; 27: 520-32.
72. Naughton B, Mylotte J, Tayara A. Outcome of nursing home-acquired pneumonia: derivation and application of a practical model to predict 30 day mortality. *J Am Geriatr Soc.* 2000; 48: 1292-9.
73. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of Candida-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35: 836-46.
74. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DMP, Vergani CE, Mima EGO, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. *Int J Prosthodont.* 2003; 16: 616-20.
75. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and longterm water immersion. *J Prosthet Dent.* 2005; 93: 171-6.
76. Niederman MS. Nosocomial pneumonia in the elderly patient: chronic care facility and hospital considerations. *Clin Chest Med.* 1993; 14: 479-90.
77. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont.* 1999; 12: 153-9.
78. Olsen CM. Microwaves inhibit bread mold. *Food Eng.* 1965; 37: 51-3.

79. Orsi IA, Junior AG, Villabona CA, Fernandes FH, Ito IY. Evaluation of the efficacy of chemical disinfectants for disinfection of heat-polymerised acrylic resin. *Gerodontology*. 2010; 1-5.
80. Palavecino E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Lab Med*. 2004; 24: 403-18.
81. Parras F, Guerrero MC, Bouza E, Blázquez MJ, Moreno S, Menarguez MC et al. Comparative study of mupirocin and oral cotrimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 175-9.
82. Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Effects of chemical disinfectants on the transverse strength of denture base acrylic resins. *J Oral Rehabil*. 2003; 30: 1085-9.
83. Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET, Teraoka MT. The effect of disinfectant solutions on the hardness of acrylic resin denture teeth. *J Oral Rehabil*. 2003; 30: 749-52.
84. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008; 72: 157-65.
85. Peltola P, Vehkalahti MM, Wuolijoki-Saaristo K. Oral health and treatment needs of the long-term hospitalised elderly. *Gerodontology*. 2004; 21: 93-9.
86. Penna TC, Mazzola PG, Silva Martins AM. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis*. 2001; 1: 16.

87. Peterson LR, Quick JN, Jensen B, Homann S, Johnson S, Tenquist J et al. Emergence of ciprofloxacin resistance in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Resistance during ciprofloxacin plus rifampin therapy for methicillin-resistant *S. aureus* colonization. Arch Intern Med. 1990; 150: 2151-5.
88. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R et al. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2612-7.
89. Pietrokovski J, Azuelos J, Tau S, Mostavoy R. Oral findings in elderly nursing home residents in selected countries: oral hygiene conditions and plaque accumulation on denture surfaces. J Prosthet Dent. 1995; 73: 136-41.
90. Pinto Lde R, Acosta EJ, Távora FF, da Silva PM, Porto VC. Effect of repeated cycles of chemical disinfection on the roughness and hardness of hard relined acrylic resins. Gerodontology 2010; 27: 147-53.
91. Raghavendran K, Mylotte J, Scannapieco F. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. Periodontology. 2007; 44: 164-77.
92. Rams TE, Slots J. Staphylococci in human periodontal diseases. Oral Microbiol Immun. 1990; 5: 29-32.
93. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Palomari Spolidorio DM, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: a randomized clinical study. J Dent. 2009; 37: 666-72.

94. Roccaforte JS, Bittner MJ, Stumpf CA, Preheim LC. Attempts to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization with the use of trimethoprim-sulfamethoxazole, rifampin, and bacitracin. *Am J Infect Control*. 1988; 16: 141-6.
95. Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization. *J Am Dent Assoc*. 1985; 110: 194-8.
96. Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios*. 1994; 78: 55-9.
97. Rossi T, Peltonen R, Laine J, Eerola E, Vuopio-Varkila J, Kotilainen P. Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. *J Hosp Infect*. 1996; 34: 311-20.
98. Rudd RW, Senia ES, McCleskey FK, Adams ED Jr. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. *J Prosthet Dent*. 1984; 51: 318-21.
99. Russell LS, Boylan JR, Kaslick SR, Scannapieco FA, Katz RV. Respiratory pathogen colonization of the dental plaque of institutionalized elders. *Spec Care Dent*. 1999; 19: 128-34.
100. Sanitá PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses*. 2009; 52: 154-60.
101. Scannapieco AF, Stewart ME, Mylotte MJ. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med*. 1992; 20: 740-5.

102. Scannapieco FA, Papandonatos GD, Dunford RG. Association between oral conditions and respiratory disease in a national sample survey population. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 251-6.
103. Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Borges AH, Pedro FML, Caporossi LS, Rosa-Júnior A. Antimicrobial activity of 2 % chlorhexidine gluconate, 1 % sodium hypochlorite and paramonochlorophenol combined with furacin against *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* and *P. aereginosa*. *Rev Odonto Ciênc*. 2010; 25: 174-7.
104. Sheng WH, Wang JT, Lauderdale TL, Weng CM, Chen D, Chang SC. Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 63: 309-13.
105. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2006; 19: 288-93.
106. Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008; 19: 364-9.
107. Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94: 149-56.

108. Silvestri L, Milanese M, Oblach L, Fontana F, Gregori D, Guerra R et al. Enteral vancomycin to control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in mechanically ventilated patients. *Am J Infect Control*. 2002; 30: 391-9.
109. Simor AE, Phillips E, McGeer A, Konvalinka A, Loeb M, Devlin HR et al. Randomized controlled trial of chlorhexidine gluconate for washing, intranasal mupirocin, and rifampin and doxycycline versus no treatment for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 178-85.
110. Smith AJ, Brewer A, Kirkpatrick P, Jackson MS, Young J, Watson S et al. Staphylococcal species in the oral cavity from patients in a regional burns unit. *J Hosp Infect*. 2003; 55: 184-9.
111. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001; 50: 940-6.
112. Smith AJ, Morrison D, Robertson D, Tang MK, Al-Doori Z. Efficacy of oral hygiene products against MRSA and MSSA isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52: 738-9.
113. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 966-73.
114. Stern MA, Whitacre RJ. Avoiding cross-contamination in prosthodontics. *J Prosthet Dent*. 1981; 46: 120-2.
115. Sumi Y, Miura H, Michiwaki Y, Nagaosa S, Nagaya M. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Arch Gerontol Geriatr*. 2007; 44: 119-24.

116. Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, Michiwaki Y, Sakagami N. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Gerodontology*. 2002; 19: 25-9.
117. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep*. 2004; 53: 1-36.
118. Tacconelli E, Carmeli Y, Aizer A, Ferreira G, Foreman MG, D'Agata EMC. Mupirocin prophylaxis to prevent *Staphylococcus aureus* infection in patients undergoing dialysis: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003; 37: 1629-38.
119. Tamaki T. Processamento da base da dentadura. In: Tamaki T. *Dentaduras completas*. São Paulo: Savier; 1983. p. 197-207.
120. Tan HK, Woo A, Kim S, Lamoureux M, Grace M. Effect of denture cleansers, surface finish, and temperature on Molloplast B Resilient liner color, hardness, and texture. *J Prosthodont*. 2000; 9: 148-55.
121. Tawara Y, Honma K, Naito Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. *Bull Tokyo dent Coll*. 1996; 37: 119-28.
122. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc*. 2001; 49: 557-63.
123. Theilade E, Budtz-Jorgensen E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture induced stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1988; 3: 8-13.

124. Turano JC, Turano LM. Limpeza e polimento: adaptação das próteses totais. In: Turano JC, Turano LM. Fundamentos de prótese total. São Paulo: Santos; 2002. p. 449-63.
125. Van Strydonck DA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden F. Clinical efficacy of a chlorhexidine-delivering toothbrush. J Clin Periodontol. 2008; 35: 584-90.
126. Verghese A, Berk S L. Bacterial pneumonia in the elderly. Medicine. 1983; 62: 271-85.
127. Walker ES, Vasquez JE, Dula R, Bullock H, Sarubbi FA. Mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: does mupirocin remain effective? Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24: 342-6.
128. Walsh TJ, Standiford HC, Reboli AC, John JF, Mulligan ME, Ribner BS et al. Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 1334-42.
129. Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, Miake F, Tsukiji T. Effect of ionic strength on the inactivation of micro-organisms by microwave irradiation. Lett Appl Microbiol. 2000; 31: 52-6.
130. Webb BC, Thomas CJ, Harty DWS, Willcox MDP. Effectiveness of two methods of denture sterilization. J Oral Rehabil. 1998; 25: 416-23.
131. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of Candida-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. Gerodontology. 2005; 22: 168-176.

132. Yeo CB, Watson IA, Stewart-Tull DE, Koh VH. Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation. *J Appl Microbiol.* 1999; 87: 396-401.
133. Yoneyama T, Yoshida M, Ohru T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50: 430-3.
134. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: A comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13: 136-40.

Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservados ao autor).

Araraquara, Março de 2011.

Karen Tereza Altieri