

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

DANIELA GARCIA RIBEIRO

*Efetividade da irradiação por
micro-ondas e da terapia
fotodinâmica na inativação de
micro-organismos presentes em
próteses totais. Estudo clínico.*

Araraquara
2009



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



DANIELA GARCIA RIBEIRO

*Efetividade da irradiação por
micro-ondas e da terapia
fotodinâmica na inativação de
micro-organismos presentes em
próteses totais. Estudo clínico.*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Prótese.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

**Araraquara
2009**

Ribeiro, Daniela Garcia

Efetividade da irradiação por micro-ondas e da terapia fotodinâmica na inativação de micro-organismos presentes em próteses totais. Estudo clínico. / Daniela Garcia Ribeiro.– Araraquara: [s.n.], 2009.

115 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

1. Micro-ondas 2. Fotoquimioterapia 3. Prótese total
4. Esterilização 5. Desinfecção 6. Controle de infecções I. Título

DANIELA GARCIA RIBEIRO

*Efetividade da irradiação por micro-ondas e da terapia
fotodinâmica na inativação de micro-organismos presentes em
próteses totais. Estudo clínico.*

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

3º Examinador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

4º Examinador: Profa. Dra. Cristina Kurachi

5º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 17 de julho de 2009.

Dados Curriculares
Daniela Garcia Ribeiro

- Nascimento:** 28 de janeiro de 1976 - Ribeirão Preto/SP
- Filiação:** Jair Garcia e Maria José Chagas Garcia
- 1997/2000:** Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2001:** Estágio de atualização - Disciplina de Odontologia Preventiva e Sanitária - Departamento de Odontologia Social - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2001/2002:** Estágio de atualização - Disciplina de Prótese Parcial Removível - Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2003/2004:** Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em Prótese - Curso de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2005/2009:** Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em Prótese - Curso de Doutorado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Dedicatória

A Deus

Minha rocha, meu escudo, meu tudo. Você que sempre me ajudou a lutar e mesmo nas tribulações nunca permitiu que eu desistisse. Amor e gratidão resumem meus sentimentos para com você. Agradeço por me dar o discernimento de saber que tudo de bom que faço, faço para Sua glória, e não para a minha. Por isso, minha felicidade está em encontrar a Sua vontade, aceitá-la e vivê-la.

*Os que nEle confiam compreenderão a verdade,
e os que Lhe são fiéis viverão junto
dEle no amor, pois a graça e a misericórdia estão
reservadas para os seus escolhidos.
(Sb 3,9)*

Aos Meus Pais

Que ao lutarem por seus filhos, esqueceram de si mesmos. Que ao desejarem o sucesso deles, abandonaram seus anseios. Que ao vibrarem com suas vitórias, esqueceram seus próprios méritos. Que ao receberem injustiças, responderam com amor. Que ao se lembrarem de nós, só têm um pedido: Deus, proteja nossos filhos, por toda a vida! Para vocês meus queridos pais, meu muitíssimo obrigada por tanta dedicação. Amo vocês imensamente!

*Quem honra o próprio pai alcança o perdão dos pecados,
e quem respeita sua mãe é como quem ajunta um tesouro.
Quem honra o seu pai terá vida longa, e quem obedece
ao Senhor dará alegria a sua mãe.
(Eclo 3,3-4;6)*

Ao Meu Eterno Amado Marcos

Melhor que ter você, é sempre ter você; Melhor que te admirar, é te admirar e te agradar; Melhor que lhe conquistar, é lhe conquistar e ter seu amor; Melhor que me descobrir, é me descobrir e te descobrir; Melhor que estar com você, é estar a cada segundo com você; Melhor que lhe dar tudo, é lhe dar sempre um pouco de que posso; Melhor que seu sorriso, é seu sorriso e sua felicidade. Igual a você não existe igual. Mesmo que existisse alguém igual, sua especialidade seria diferente, e tão marcante, que você seria o melhor dos iguais. Melhor que não lhe perder, é ter lhe encontrado; Melhor que você, só você. Melhor que te amar, é te amar, te amar, te amar... Te amo demais, como jamais amei ninguém! Não tenho mais palavras pra expressar a gratidão que sinto por receber de você tanto carinho e apoio, tanta força e oração.

*O amor é paciente, o amor é prestativo; não procura seu próprio interesse, não se irrita, não guarda rancor. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais passará.
(I Cor 13,4-5;7)*

... dedico este trabalho.

Agradecimentos Especiais

À **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina**, orientadora e amiga, que sempre demonstrou acreditar em mim, pela oportunidade oferecida, pela orientação, pelo apoio e principalmente pelo bom convívio durante esses nove anos de trabalho. Por intermédio dela tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento. Sua disponibilidade, sua maneira exigente e crítica com os trabalhos possibilitaram meu crescimento científico e a concretização desta pesquisa. À Ana, meus sinceros agradecimentos!!!

Aos **Professores Membros da Banca Examinadora**, por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Ana Lucia, Carlos e Eunice** pelos conhecimentos transmitidos, pela demonstração de trabalho competente, seriedade e amizade.

Ao **Prof. Vanderlei Salvador Bagnato**, pela disponibilidade, atenção e confiança em meu trabalho.

À **Profa. Cristina Kurachi**, por toda ajuda e disponibilidade.

À **Profa. Denise**, responsável pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, onde foi realizada a fase experimental desta pesquisa.

Agradecimentos Especiais

Aos meus amados irmãos **Josiane** e **André**, pelo respeito, pelo carinho, pela amizade, apoio, companheirismo e, apesar da distância, sempre estão presentes em minha vida, torcendo por mim e acreditando na minha capacidade.

Aos meus queridos sobrinhos **Mariana, Adriana, Júnior, João Victor, Vinícius** e **Julio**, os quais amo como se fossem meus filhos. Sempre tenho saudade... Obrigada pelo carinho.

À querida tia **Genira**, pela demonstração de um grande amor por mim, em quem me espelho para ter muita fortaleza nas tribulações da vida.

À amiga **Leila**, pelo exemplo de perseverança, pelo carinho dispensado a mim, pelas orações e grande alegria.

À amiga e técnica **Sônia**, pela atenção em todos os momentos, pela colaboração na execução deste trabalho, em quem pude encontrar confiança, respeito e o meu reconhecimento. Quero expressar minha estima e gratidão.

Ao querido **Padre José Roberto**, que nos acolheu com muito amor em sua paróquia, pela disponibilidade, pelo carinho e principalmente pelas orações que tanto nos ajudaram nos momentos de dificuldades.

Agradecimentos Especiais

Aos meus sempre amigos **Paula, Mariana, Livia** e **Ewerton**, que juntos formamos o quinteto fantástico: **PAMADALIEW**.

As pessoas que por nossas vidas passam deixam marcas que jamais se apagam. Marcas de alegria e generosidade; É a Paula.

Marcas de simplicidade e paciência; É a Mariana.

Marcas de sabedoria e conselho; É a Livia.

Marcas de inteligência e tranquilidade; É o Ewerton.

Tudo fica guardado na memória, num cantinho especial, bem no fundo do coração.

O amigo de verdade compreende e sabe o que o outro necessita, sempre está disposto a ajudar: você vai conseguir, vamos, não desista. É assim o quinteto PAMADALIEW.

Que maravilha poder ter vocês como meus amigos. Obrigada por sofrerem e se alegrarem comigo. Obrigada pela ajuda imprescindível de vocês sempre que precisei.

A amizade verdadeira dura até a eternidade, pois é um dom que vem de Deus.

Amigo fiel é proteção poderosa, e quem o encontrar, terá encontrado um tesouro.

Amigo fiel não tem preço, e o seu valor é incalculável.

Amigo fiel é remédio que cura, e os que temem ao Senhor o encontrarão.

*Quem teme ao Senhor tem amigos verdadeiros,
pois tal e qual ele é, assim será o seu amigo.*

(Eclo 6,14-17)

Agradecimentos

Às professoras e amigas **Patrícia Nordi, Juliana Campos e Paty Aleixo**, pelo incentivo e apoio constantes, pela competência e principalmente pela dignidade e amizade sincera.

Aos meus sogros **Clarice e João**, pelo zelo e carinho para comigo.

Às amigas fiéis **Danilla, Isabela e Sandra**, pelo carinho, e mesmo distantes, nunca se esquecem de mim.

À amiga “filhinha” **Amandinha**, pelo carinho, pela companhia, por fazer mais alegres meus momentos de ausência do Marcos.

Aos meus colegas de Doutorado, **Ana Carolina, Ana Paula, Anelise, Andréa, Daniela, Ewerton, João Gustavo, José Maurício, Luciano, Marcelo, Mariana, Matheus, Michael e Roberta**, pela atenção e disponibilidade em sempre ajudar.

Agradecimentos

Aos amigos da comunidade removível, **Mari, Zé Maurício, Paulinha, Paty, Cadu, Andreinha, Zeca, Camilinha, Carol, Amandinha, Miminha, Lilica, Flavinha, Aninha, Michael, Robertinha, Fer e Du**, pelo carinho e disponibilidade em sempre ajudar.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Ao Prof. Dr. **José Cláudio Martins Segalla**, diretor desta Instituição.

Ao Conselho de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, especialmente ao Prof. Dr. **Carlos Eduardo Vergani**, pela responsabilidade, seriedade e dedicação no desempenho de suas funções.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, pela orientação, dedicação e ensinamentos, essenciais para minha formação profissional.

Aos amigos da Pós-Graduação, especialmente a **Paula, Lívia, Juliê, Isabela e Laiza** pelo incentivo, amizade, companheirismo e por todos os momentos que passamos juntas.

Agradecimentos

Às queridas amigas super poderosas **Janaína, Karin, Nara, Rosângela** e **Vanessa**, pelo carinho, pela ajuda constante, as quais tenho como exemplos de determinação, competência e vencedoras de desafios.

Às amigas **Cristiane Duque, Juliana Ricco** e **Thaís Negrini**, pelos ensinamentos relacionados aos procedimentos microbiológicos realizados neste estudo.

Às secretárias **Silvinha** e **D. Inês**, pela ajuda durante o atendimento de pacientes no centro de pesquisas.

Às bolsistas de treinamento técnico da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Sônia, Estela, Tatiana, Andréia, Manoela** e **Ana Patrícia**, pela atenção e disponibilidade para ajudar.

À técnica do Laboratório de Microbiologia **Juliana Pirola**, por sempre estar disponível para ajudar.

À aluna **Fernanda Vargas**, pela preocupação e pela ajuda no laboratório de Microbiologia.

Aos **Pacientes** que participaram deste estudo, pela colaboração e carinho que me ofereceram e que fizeram valer todo meu esforço.

Agradecimentos

Aos **Funcionários** do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Pós Graduação, da Biblioteca, da Portaria, pela amizade, solicitude e disponibilidade em ajudar.

À secretária do Instituto de Física da USP de São Carlos **Isabel**, pela maneira atenciosa com que sempre me atendeu.

À Senhora **Lucia Montoro**, pelo capricho e atenção dados na revisão da língua portuguesa.

Às senhoras **Margery** e **Renata**, pela revisão do inglês dos artigos científicos que constam na Tese.

Aos **Engenheiros** do laboratório do Instituto de Física da USP de São Carlos, em especial ao **Orlando**, que montou o aparelho de LED utilizado neste estudo e que sempre se prontificou a consertá-lo quando ocorria algum inconveniente.

Ao Prof. **Dalton**, pela realização da análise estatística da Tese, relacionada aos procedimentos utilizando as micro-ondas, pelos ensinamentos, pela calma e paciência.

Agradecimentos

À aluna **Mariana** do curso de Estatística da UFSCAR, que sob orientação do Prof. **Jorge Oishi**, realizou a análise da Tese, relacionada aos procedimentos utilizando a terapia fotodinâmica, pelos ensinamentos e pela paciência.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de Doutorado processo No. 2005/02192-8 e pela concessão do Auxílio à Pesquisa processo No. 2005/02384-4, os quais tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos **Familiares** e **Amigos** que me incentivaram, torceram por mim e demonstraram carinho durante toda nossa convivência.

A **Todos** que, embora não tenham sido citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Minha eterna gratidão...

*Há duas formas para se viver a vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.*

Albert Einstein

Sumário

Resumo.....	16
Abstract.....	19
1 Introdução.....	22
2 Proposição.....	28
3 Capítulos.....	30
3.1 Capítulo 1.....	31
3.2 Capítulo 2.....	38
4 Discussão.....	62
5 Conclusão.....	73
6 Referências.....	75
7 Apêndice.....	86
8 Anexo.....	106



RESUMO

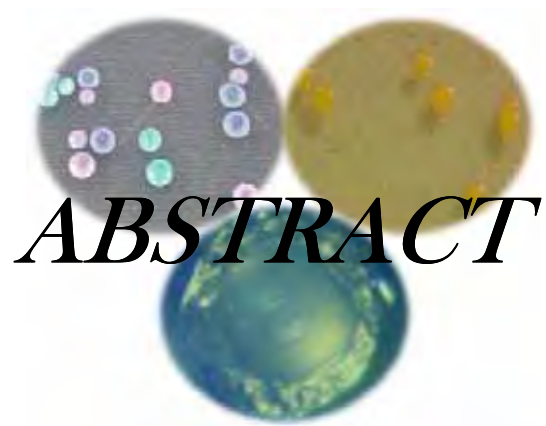
Ribeiro DG. Efetividade da irradiação por micro-ondas e da terapia fotodinâmica na inativação de micro-organismos presentes em próteses totais. Estudo clínico [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

Resumo

As próteses removíveis estão em contato direto com os tecidos bucais, saliva e sangue e, ao serem removidas da cavidade bucal do paciente, podem estar contaminadas com micro-organismos patogênicos. Esses micro-organismos podem ser transmitidos aos técnicos de laboratório por contato direto ou pelos aerossóis produzidos durante o desgaste ou o polimento de próteses contaminadas. Neste caso, os micro-organismos podem ser disseminados pelo ambiente, desencadeando infecção cruzada. Assim, para prevenir a contaminação cruzada, todas as próteses devem ser desinfetadas ao serem enviadas ao laboratório e ao retornarem ao consultório. Com base nessas considerações, o presente estudo avaliou a efetividade clínica da irradiação por micro-ondas e da terapia fotodinâmica (PDT) para desinfecção de próteses totais superiores. Para os procedimentos de irradiação por micro-ondas, amostras de biofilme das próteses foram coletadas de 30 pacientes, os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais com 15 indivíduos cada: Grupo 1 - as próteses foram expostas às micro-ondas durante 3 minutos (650 W), Grupo 2 - as próteses foram expostas às micro-ondas durante 2 minutos (650 W). Para os tratamentos com PDT, amostras de biofilme das próteses foram coletadas de 60 pacientes, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 15 cada): Grupos I e II - as próteses foram borrifadas com 50 mg/L e 100 mg/L do Photogem[®] em suspensão, respectivamente; Grupos III e IV - as próteses foram tratadas com 50 mg/L e 100 mg/L de Photogem[®] em gel, respectivamente. Após 30 minutos de pré-irradiação, todas as 60 próteses foram expostas à luz de LED azul com potência de 37,5 J/cm² (26 minutos). Amostras das próteses foram obtidas utilizando-se swab estéril antes (nas superfícies do lado esquerdo) e após (nas superfícies do lado direito) a aplicação das micro-ondas e da PDT. Todo o material microbiológico foi diluído e plaqueado em meios seletivos para *Candida*

spp., *Staphylococcus* spp., mutans streptococci e em um meio não-seletivo. Após incubação (48 horas/37°C), o número de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) foi calculado. Os micro-organismos que cresceram nos meios seletivos foram identificados utilizando-se métodos bioquímicos antes e após os procedimentos de desinfecção. Os dados obtidos a partir dos experimentos com as micro-ondas foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). Os dados obtidos para os experimentos de PDT foram submetidos aos testes estatísticos de McNemar e Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). A irradiação por micro-ondas durante 3 minutos (Grupo 1) promoveu a esterilização de todas as próteses avaliadas. Após 2 minutos de exposição às micro-ondas (Grupo 2), uma diminuição significativa para *Candida* spp. ($P = 0,0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0,0178$), mutans streptococci ($P = 0,0047$) e para o meio não-seletivo ($P < 0,0001$) foi alcançada quando os valores obtidos foram comparados com os valores de ufc/mL de antes da irradiação. Após a PDT, foi observada esterilização de 40%, 47%, 53% e 60% das próteses, para os grupos I, II, III e IV respectivamente. Quando ocorreu a desinfecção das próteses, os tratamentos de PDT inativaram mais de 90% dos micro-organismos das próteses. A irradiação com micro-ondas por 3 minutos pode ser um método apropriado para prevenir a contaminação cruzada, uma vez que promoveu a esterilização das próteses avaliadas. A PDT mostrou ser um método eficaz para a desinfecção de próteses.

Palavras-chave: Micro-ondas; fotoquimioterapia; prótese total; esterilização; desinfecção; controle de infecções.



ABSTRACT

Ribeiro DG. Effectiveness of microwave irradiation and photodynamic therapy on the inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical study [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

Abstract

Prosthetic appliances that have been in contact with oral tissues, saliva and blood can be contaminated with pathogenic microorganisms when they are removed from the patient's mouth. These microorganisms can be transmitted to laboratory staff through direct contact with the infected denture or from aerosols that will be formed when the surfaces are ground or polished. In this case, microorganisms with varying degrees of virulence can be spread and disseminated into the air, leading to cross-infection. In order to prevent microbial cross-contamination among denture patients, all dental prostheses must be disinfected on entering and again on leaving the laboratory. Therefore, this investigation evaluated the clinical effectiveness of microwave irradiation and photodynamic therapy (PDT) on the inactivation of microorganisms present on complete dentures. For microwave irradiation procedures, biofilm samples were collected from dentures of 30 patients, who were randomly divided into two experimental groups of 15 subjects each: Group 1 - patients had their maxillary denture microwaved for 3 minutes (650 W); Group 2 - patients had their maxillary denture microwaved for 2 minutes (650 W). For PDT treatments, biofilm samples were collected from dentures of 60 patients, who were randomly divided into four experimental groups (n = 15 each): Groups I and II - patients had their maxillary denture sprayed with 50 mg/L and 100 mg/L of Photogem[®] suspension, respectively; Groups III and IV - patients had their maxillary denture treated with 50 mg/L and 100 mg/L of Photogem[®] gel, respectively. After 30 minutes of pre-irradiation, all sixty dentures were exposure to blue LED light at 37.5 J/cm² (26 minutes). Denture samples were taken with sterile cotton swabs, before (left side surfaces) and after (right side surfaces) microwave irradiation and PDT procedures. All microbial material was diluted and plated on selective media for *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., mutans

streptococci and a non-selective media. After incubation (48 hours/37°C), the number of colony-forming units (cfu/mL) was counted. Microorganisms which grew on selective media were identified using biochemical methods before and after disinfection methods. The data obtained from microwave irradiation experiments were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post test ($\alpha = 0.05$). The data obtained from PDT experiments were submitted to McNemar and Kruskal-Wallis tests ($\alpha = 0.05$). Microwave irradiation for 3 minutes (Group 1) resulted in sterilization of all dentures evaluated. After microwave irradiation for 2 minutes (Group 2), a significant decrease in *Candida* spp. ($P = 0.0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0.0178$), mutans streptococci ($P = 0.0047$) and non-identified species ($P < 0.0001$) was achieved in comparison with the cfu/mL obtained before irradiation. Sterilization after PDT was observed in 40%, 47%, 53% and 60% of dentures, for Groups I, II, III and IV, respectively. When disinfection of the dentures occurred, PDT regimens eliminated more than 90% of microorganisms from dentures. Microwave irradiation for 3 minutes may be a potential treatment to prevent cross-contamination, since it promoted the dentures sterilization. PDT showed to be an effective method for disinfecting dentures.

Key words: Microwaves; photochemotherapy; complete denture; sterilization; disinfection; infection control.



INTRODUÇÃO

1 Introdução

O controle da infecção cruzada tem sido um tema de interesse para a área odontológica nas últimas décadas devido à preocupação com a transmissão de doenças infecto-contagiosas como AIDS, hepatite, tuberculose, pneumonia e herpes entre o consultório odontológico e o laboratório de prótese. Essa preocupação teve início na década de 1970, quando o micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis* foi isolado de moldes de pacientes⁵⁷ e foi constatada a transmissão do *Mycoplasma pneumoniae* para técnicos de laboratório quando desgastavam próteses contaminadas⁶⁴. Powell et al.⁵⁶ observaram que 67% de todos os materiais recebidos nos laboratórios, entre coroas, moldagens, registros em cera e próteses, estavam contaminados com micro-organismos patogênicos. Segundo Chau et al.¹⁶, os técnicos de laboratório têm a responsabilidade inicial no controle da infecção cruzada entre o consultório odontológico e o laboratório de prótese. Além da contaminação via paciente, tem sido relatado que as próteses são contaminadas em vários estágios durante a sua confecção^{76,80,85}, podendo transmitir micro-organismos para outros materiais, equipamentos odontológicos e também para os técnicos de laboratório que manipulam esses itens^{38,80}. Kahn et al.³⁸ verificaram que próteses estéreis foram contaminadas durante o polimento realizado com a pedra-pomes e a roda de pano que estavam sendo utilizadas nos laboratórios por eles avaliados.

A colocação de prótese removível na cavidade bucal pode causar alterações quantitativa e qualitativa na microbiota local, acarretando aumento do número de micro-organismos bem como a predominância de certas espécies microbianas⁹. Essas alterações podem predispor o paciente a enfermidades como cárie, doença periodontal e inflamação da mucosa⁸⁸. Estudos microscópicos têm demonstrado que um biofilme, semelhante ao formado nos dentes naturais, está presente nas próteses⁴⁷, exceto pela elevada quantidade de *Candida spp.*^{11,47,72}. Além desse fungo, algumas espécies bacterianas associadas a doenças sistêmicas têm sido encontradas em próteses removíveis, com predominância de bactérias

gram-positivas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp.) e gram-negativas (*Neisseria perflava*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*)^{29,44,54}. Estudo recente³ demonstrou a prevalência dos micro-organismos *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* na parte interna de próteses totais de pacientes. *C. albicans* foi isolada em 66,7% das próteses, enquanto *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 49,5% dessas próteses. Outras investigações^{29,70} também confirmam a presença de espécies de *Candida*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* colonizando as superfícies acrílicas de próteses dentais. Algumas dessas pesquisas relacionaram a colonização das próteses com o desenvolvimento de infecções sistêmicas⁷⁰, como pneumonia, e infecções locais³, como estomatite protética. Esses micro-organismos apresentam capacidade de aderência às células epiteliais da mucosa e à resina da base das próteses⁴⁸. Dessa forma, a prótese pode funcionar como reservatório de micro-organismos, possibilitando a transmissão de doenças no consultório odontológico e deste ao laboratório de prótese^{16,56}. Assim, é fundamental a limpeza e a desinfecção das próteses de forma que as doenças relacionadas à sua utilização, bem como à infecção cruzada, possam ser prevenidas.

Considerando que não há normas claras que orientem os profissionais quanto à desinfecção das próteses, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de definir qual seria o método mais adequado para esse procedimento. Entre os métodos utilizados para desinfecção de próteses removíveis parciais e totais, destacam-se aqueles que empregam agentes químicos e físicos. Entre os métodos químicos, a utilização de soluções químicas como glutaraldeído, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, iodóforo, álcool e clorexidina tem sido recomendada^{34,41,61}. Uma solução desinfetante ideal deveria inativar os micro-organismos, ser biologicamente compatível e não promover alterações sobre os materiais que compõem a prótese. No entanto, o que se tem observado é que essas soluções podem causar efeitos deletérios sobre as propriedades físicas e mecânicas das resinas acrílicas^{1,2,62}.

Um método físico que tem demonstrado ser eficiente na inativação de micro-organismos presentes em próteses é a irradiação por micro-ondas^{4,5,59,84}. A desinfecção ou a esterilização com o uso das micro-ondas, comparadas à imersão das próteses em soluções químicas, apresenta a vantagem de não irritar os tecidos bucais pela impregnação de substâncias nas porosidades, como ocorre com alguns desinfetantes, mesmo após o enxágue das próteses⁶². Roher, Bulard⁵⁹ (1985) demonstraram que próteses contaminadas com micro-organismos patogênicos foram esterilizadas quando submetidas à energia de micro-ondas a 720 W, por 10 minutos, desde que acopladas a um dispositivo tridimensional. Esses autores também observaram que a irradiação pelas micro-ondas não promoveu alterações dimensionais nas próteses. Webb et al.⁸⁴ demonstraram que próteses totais inoculadas com *Candida albicans* e *Streptococcus gordonii* foram esterilizadas após 6 minutos de exposição a uma potência de 350 W. A energia de micro-ondas também já foi utilizada no tratamento de pacientes com estomatite protética^{4,46,83}. Nesses estudos, foi observado que a exposição às micro-ondas foi efetiva para a desinfecção das próteses totais superiores pertencentes a esses pacientes. Em duas das investigações mencionadas, as avaliações foram realizadas com as amostras não imersas em água. Dixon et al.²³ observaram que 5 minutos de irradiação por micro-ondas em potência máxima não esterilizou três resinas reembasadoras resilientes e uma resina acrílica para base de prótese quando as amostras não foram imersas em água. No entanto, as amostras foram esterilizadas quando as resinas avaliadas foram imersas em água durante a irradiação em micro-ondas. Além disso, outros estudos também sugeriram o umedecimento dos materiais antes da irradiação em micro-ondas para se obter uma maior efetividade no procedimento de desinfecção^{27,36}. Esses resultados sugerem que a desinfecção em micro-ondas é mais efetiva se as amostras estiverem imersas em água.

Além das micro-ondas, também tem sido relatada outra modalidade de tratamento físico para inativação de micro-organismos: a terapia fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{12,22,86}. Esse método associa um agente fotossensibilizante (FS) e uma fonte de luz de comprimento de onda adequado, resultando na formação de produtos citotóxicos, que são letais para as células

sensibilizadas. Inicialmente, a principal aplicação da PDT era para o tratamento de tumores¹⁰, visando à inativação de células malignas. Contudo, seguindo os mesmos princípios terapêuticos, a PDT antimicrobiana tem demonstrado sucesso no tratamento de infecções microbianas⁷⁸ em virtude da crescente resistência de micro-organismos a agentes antimicrobianos. Estudos in vitro têm demonstrado efetividade da PDT na inativação de vírus⁷⁹, bactérias⁷⁴ e fungos⁷ utilizando diversas associações de FS e fontes de luz. Paulino et al.⁵¹ demonstraram que a PDT mediada pelo FS Rose Bengal e por luz de fotopolimerizador odontológico promoveu inativação de *Streptococcus mutans*. Outro estudo⁸⁶ avaliou a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans*, examinando dois tipos de laser de baixa intensidade juntamente com vários corantes. Foi observado que a associação entre o laser de He-Ne e o corante azul de toluidina foi o procedimento mais efetivo na inativação de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida*.

No caso da PDT antimicrobiana, os micro-organismos são tratados primeiramente com um FS, que se torna concentrado nas células (fotossensibilização). Esses agentes apresentam uma absorção máxima de luz específica, sendo alguns comprimentos de onda preferencialmente absorvidos. Caso a absorção do FS corresponder ao comprimento de onda da luz utilizada, maior radiação será absorvida pelo fotossensibilizador, promovendo sua inativação. O mecanismo responsável pela inativação dos micro-organismos envolve a formação de oxigênio singleto e de radicais livres, que são letais para a célula microbiana⁴².

Vários tipos de fonte de luz têm sido utilizados, assim como vários tipos de FSs. Estudos demonstraram inativação efetiva de patógenos utilizando luz halógena³⁹, luz de fotopolimerizador⁵¹, laser⁸⁶ e LED (diodos emissores de luz)⁸⁷. É importante considerar que a fonte de luz não deve aquecer as amostras irradiadas, evitando lesões nas células dos tecidos do hospedeiro e dos micro-organismos. Nesse contexto, a utilização do LED e do laser seria mais indicada. O laser destaca-se das demais fontes de luz por apresentar feixe de luz monocromático, coerente e colimado. Por outro lado, o LED apresenta emissão de luz espontânea, policromática (abrangendo uma faixa estreita do espectro de luz),

não coerente e com certo espalhamento. Além disso, o custo do aparelho é menor e sua tecnologia é mais simples quando comparado aos aparelhos de laser⁸⁷.

Alguns compostos químicos corantes, como as fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno), as cianinas (indocianina verde), os fitoterápicos (azuleno) e as ftalocianinas têm sido avaliados quanto à sua capacidade fotossensibilizadora em micro-organismos. Os compostos derivados da hematoporfirina (do inglês, *haematoporphyrin derivative* ou HpD) consistem de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros e são produzidos, de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir da hematoporfirina IX existente na circulação sanguínea. Esses FSs são amplamente utilizados para o tratamento de câncer com PDT⁴², entre eles destacando-se o Photofrin[®], o Photogem[®] e o Photosan[®]. Alguns estudos in vitro têm demonstrado que a utilização tópica desses compostos pode ser efetiva também na fotoinativação de bactérias e fungos^{6,74}.

Na seleção dos FSs, deve ser considerada a sua capacidade de absorver a luz no comprimento de onda utilizado na irradiação, o seu potencial de produzir espécies reativas e a sua seletividade às células microbianas, de modo que não haja efeitos deletérios ao tecido adjacente durante a irradiação. O local de ação do FS na célula pode variar de acordo com a morfologia da espécie microbiana e com o tempo de pré-irradiação. Um FS incorporado ao micro-organismo, após pouco tempo de pré-irradiação, pode causar um dano na parede celular depois de sua exposição à luz, enquanto um tempo maior de pré-irradiação entre corante e micro-organismo pode resultar em ruptura de ácidos nucléicos⁷⁸.

Analisando os aspectos abordados, consideramos importante avaliar a efetividade da irradiação por micro-ondas e da PDT na inativação de micro-organismos presentes em próteses totais em uso por pacientes.



PROPOSIÇÃO

2 Proposição

Os estudos desenvolvidos tiveram por objetivo avaliar clinicamente a efetividade da irradiação com micro-ondas e da terapia fotodinâmica na inativação de micro-organismos presentes em próteses totais.



3 Capítulos

3.1 Capítulo1

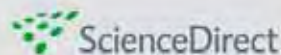
DOD-1408; No of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

JOURNAL OF DENTISTRY XXX (2009) XXX-XXX



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/jden



Denture disinfection by microwave irradiation: A randomized clinical study

Daniela Garcia Ribeiro^a, Ana Cláudia Pavarina^{a,*}, Lívia Nordi Dovigo^a, Denise Madalena Palomari Spolidorio^b, Eunice Teresinha Giampaolo^a, Carlos Eduardo Vergani^a

^aR. Humaitá n° 1680, CEP 14801-903, Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University, UNESP, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil

^bR. Humaitá n° 1680, CEP 14801-903, Department of Physiology and Pathology, São Paulo State University, UNESP, Araraquara Dental School, Araraquara, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2009

Received in revised form

16 April 2009

Accepted 24 April 2009

Keywords:

Microwaves

Complete denture

Sterilization

Disinfection

Infection control

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the clinical effectiveness of two exposure times of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures.

Methods: Biofilm samples were collected from dentures of 30 patients, who were randomly divided into two experimental groups of 15 subjects each: Group 1—patients had their maxillary denture microwaved for 3 min (650 W); Group 2—patients had their maxillary denture microwaved for 2 min (650 W). Denture biofilm samples were taken with swabs, before (left side surfaces) and after (right side surfaces) microwave irradiation. All microbial material was plated on selective media for *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., mutans streptococci and a non-selective media. After incubation (48 h/37 °C), the number of colony-forming units (cfu/mL) was counted. Microorganisms which grew on selective media were identified using biochemical methods. The data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test ($\alpha = 0.05$).

Results: Microwave irradiation for 3 min (Group 1) resulted in sterilization of all dentures evaluated. After microwave irradiation for 2 min (Group 2), a significant decrease in *Candida* spp. ($P = 0.0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0.0178$), mutans streptococci ($P = 0.0047$) and non-identified species ($P < 0.0001$) was achieved in comparison with the cfu/mL obtained before irradiation. The colonies grown after 2 min of microwave irradiation were identified as *Candida albicans*, non-aureus *Staphylococci* and *Streptococcus mutans*.

Conclusion: Microwave irradiation for 3 min may be a potential treatment to prevent cross-contamination.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One of the main issues involved in wearing dental prostheses is the roughness of acrylic material, which promotes plaque formation on denture surfaces and the likelihood of micro-

organisms accumulating.¹ Denture plaque consists of a structured community of microorganisms surrounded by a self-produced polymeric matrix and adherent to an inert or living surface.² These complex biofilms have particular functions to avoid their detachment from the surface and

* Corresponding author at: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, R. Humaitá n° 1680, CEP 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 016 33016410; fax: +55 016 33016406.

E-mail address: pavarina@foar.unesp.br (A.C. Pavarina).

0300-5712/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jdent.2009.04.009

protect them from host defence mechanisms. Studies^{3,4} have demonstrated that different species of oral and non-oral pathogens are associated with denture plaque, including *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. and *Actinomyces* spp. These microorganisms are frequently related to local diseases⁵ such as caries, periodontal disorders and mucosa inflammation, and systemic infections such as urinary tract infections, conjunctivitis, pneumonia and meningitis.⁴

The microorganisms adhered to the denture surface create a potential source of contamination from patients to dental and laboratory personnel. Powell et al.⁶ observed that 67% of all materials sent from dental offices to the dental laboratories were infected with opportunistic pathogens. Thus, to reduce the chances of cross-contamination in the dental environment, dentures should be completely disinfected before being sent to the laboratory and before insertion. Some chemical agents have been proposed to reduce microbial contamination of prostheses.^{7,8} However, denture-soaking solutions can cause deleterious effects on acrylic resins.^{9,10}

Since the disinfection method should be effective without having any detrimental effect on acrylic denture materials, a major research effort has been focused on alternative methods for prostheses decontamination. Microwaving dentures have been suggested as a simple, inexpensive and effective method of disinfection.¹¹⁻¹⁵ Rohrer and Bulard¹³ reported that complete dentures contaminated with individual suspensions of aerobic bacteria and fungi were sterilized after 10 min of microwave irradiation (720 W). It was also demonstrated that microwave irradiation at 350 W for 6 min was a more effective method of inactivating microorganisms on dentures than soaking in sodium hypochlorite.¹⁴ Buegers et al.¹⁶ showed that microwave irradiation (6 min/800 W) significantly decreased *Candida albicans* colonization in soft denture relining specimens. A preliminary study¹⁷ verified that acrylic resin specimens colonized with *C. albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* were sterilized after 6 min of microwave irradiation at 650 W. Another investigation¹⁸ also observed that 6 min at 650 W was sufficient to inactivate *C. albicans* and *Staphylococcus aureus* obtained from simulated complete dentures. Furthermore, microwave irradiation (6 min/650 W) of complete maxillary dentures was effective for the treatment of *Candida*-related denture stomatitis.¹⁹ Although 6 min of microwaving at 650 W has proved to be an effective method for acrylic resin sterilization^{17,18} and for the treatment of denture stomatitis,¹⁹ it has been observed that this practice decreased the flexural strength of a hard chairside relining resin²⁰ and the surface hardness of 5 brands of acrylic resin denture teeth.²¹ Moreover, Seo et al.²² verified that thermal and mechanical stress exerted deleterious effects on the strength of intact and/or relined denture bases after 6 min of microwave irradiation (650 W).

Therefore, several studies^{11,14,21,24} have been developed to evaluate microwave exposure times shorter than 6 min. Sterilization of wet acrylic resin specimens inoculated with individual suspensions of four microorganisms (*C. albicans*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *B. subtilis*) was achieved after 3, 4 and 5 min at 650 W of microwave irradiation.²³ Ribeiro et al.²⁴ demonstrated that the flexural strength and

hardness of different acrylic resin specimens were not detrimentally affected by irradiation with microwaves for 1, 2, 3, 4 or 5 min in a wet condition. However, there is a lack of reports in the literature, which evaluated the effectiveness of these microwave irradiation times for the clinical disinfection of complete dentures immersed in water.

Thus, this clinical study tested the hypothesis that complete maxillary dentures worn by patients could be sterilized by microwave irradiation to avoid cross-contamination.

2. Materials and methods

2.1. Patient selection

A total of 30 patients, maxillary complete denture wearers aged between 45 and 80 years, who were attended at the Araraquara Dental School - UNESP, were included in the present study. The patients were invited to participate in the survey by telephone. The subjects were healthy people and their dentures had been in use for at least 6 months. Furthermore, one of the inclusion criteria was that the volunteers had not, or were not soaking dentures in a disinfectant solution. All the patients received verbal oral hygiene instructions. The examiners wore gloves, protective clothing, masks and eye protection during all clinical and laboratory procedures. After attending each patient and performing microbial culture, the operator's gloves were discarded and replaced with sterile gloves. The protocol (26/2005) of each treatment was reviewed by the Ethics Committee of the Araraquara Dental School - São Paulo State University and each patient provided written consent to participate in this study.

2.2. Experimental groups

The patients ($n = 30$) were randomly assigned to one of two experimental groups (Group 1 and Group 2) of 15 subjects each. Blind investigators were responsible for clinical procedures, such as: first denture collection, microwave irradiation and second denture collection. Microbiological procedures were carried out by one investigator. A first collection of biological material (control) of each denture ($n = 30$) was made before microwave exposure. Control samples were collected from the left half of all denture surfaces, which were vigorously rubbed for 1 min with a sterile cotton swab. Denture biofilm samples were placed in tubes containing 4.5 mL of sterile saline solution. After that, each maxillary denture was individually transferred to a 600 mL beaker containing 200 mL of sterile distilled water. Each beaker was placed on the rotational plate in a domestic microwave oven (Model Sensor Crisp 38, Brastemp, Double Emission System, Manaus, AM, Brazil) and irradiated once for 3 min (Group 1) or 2 min (Group 2) at 650 W. Following the same procedure as above, a second collection of biological material from each denture ($n = 30$) was made after microwave irradiation.

2.3. Microbiological examination

The saline tubes obtained before and after microwave irradiation were vortexed for 1 min to disperse microorganism

segregates. All microbial material was diluted (10^{-1} to 10^{-3}) in saline solution and aliquots of each dilution (25 μ L) were plated on selective media for *Candida* spp. (CHROMagar), *Staphylococcus* spp. (Mannitol Salt Agar), mutans streptococci (SB20) and a non-selective media (Mueller Hinton). The plates were incubated aerobically at 37 °C for 48 h, except for mutans streptococci, which was incubated in candle jars. After incubation for 48 h, microbial colony counts of each plated denture were quantified using a digital colony counter (Phoenix CP 600 Plus, Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltd, Araraquara, SP, Brazil). The logarithm of colony-forming units per milliliter (log cfu/mL) was then calculated. The colonies were also identified by conventional biochemical methods. *Candida* species were identified by CHROMagar *Candida* (Probac/Brazil) media and confirmed by biochemical tests (germ-tube tests, chlamyospore formation, assimilation and fermentation of sugars).^{25,26} Moreover, an appropriate identification test was required to distinguish *C. albicans* from *Candida dubliniensis*. All *C. albicans* samples identified by CHROMagar *Candida* were submitted to the thermotolerance test (growth at 42 and 45 °C).²⁷ *Staphylococcus* spp. isolates were subcultured onto Mannitol Salt Agar media. The isolate, which formed a yellow colony, is referred to as *Staphylococcus aureus* and it was plated on CHROMagar *Staphylococcus*. For *Staphylococcus aureus*, this culture media provides the growth of purple colonies. The *Staphylococcus aureus* strains were identified by the coagulase test using rabbit plasma.²⁸ Mutans streptococci were identified by observing the physiological characteristics and using biochemical tests (fermentation of mannitol, sorbitol, melibiose and raffinose, hydrolysis of arginine, resistant to bacitracin and hydrogen peroxide produced) in accordance with Bergey's Manual.²⁹

2.4. Statistical analysis

Because the log cfu/ml. values among the groups had an inhomogeneous distribution, the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to test the effectiveness of microwave irradiation for 2 min. A 95% confidence level ($\alpha = 0.05$) was used. If significant differences in the log cfu/mL numbers were found, pairwise multiple comparison procedures (Dunn's method) were performed to analyze the data.

3. Results

Three minutes of microwave irradiation at 650 W (Group 1) resulted in sterilization of all dentures evaluated, since no microbial growth was detected in selective and non-selective media. On the other hand, microwaving for 2 min at 650 W (Group 2) promoted disinfection of dentures, because microorganisms were not completely eliminated from samples. A significant decrease in *Candida* spp. ($P = 0.0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0.0178$), mutans streptococci ($P = 0.0047$) and non-identified species ($P < 0.0001$) was achieved in comparison with the cfu/ml. obtained before irradiation (Fig. 1). The colonies grown after 2 min of microwave irradiation were identified as *C. albicans*, non-aureus *Staphylococci* and *Streptococcus mutans*.

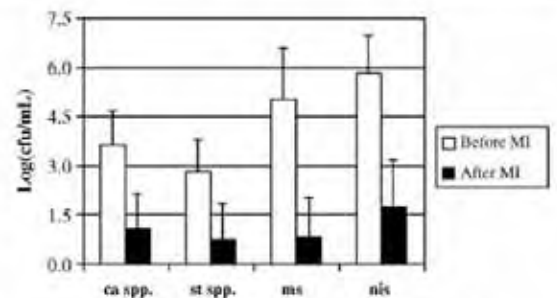


Fig. 1 - Mean and standard deviation of growth of microorganisms before and after microwave irradiation (MI) for 2 min at 650 W. ca spp.: *Candida* spp.; st spp.: *Staphylococcus* spp.; ms: mutans streptococci and nis: non-identified species.

Table 1 - Prevalence of the different species identified in 30 maxillary dentures before microwave irradiation.

	Dentures (n = 30)	
	Number	%
<i>Candida</i> spp.	23	76.6
<i>Candida albicans</i>	23	76.6
<i>Candida glabrata</i>	4	13.3
<i>Candida tropicalis</i>	1	3.3
<i>Staphylococcus</i> spp.	20	66.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	26.6
Non-aureus <i>Staphylococci</i>	12	40.0
Mutans streptococci	16	53.3
<i>Streptococcus mutans</i>	16	53.3

Before microwave irradiation, all dentures belonging to Group 1 and Group 2 demonstrated microbial growth in the non-selective media. Cultures from selective media revealed that *Candida* spp. were the most frequent microorganism (76.6%) in dentures, while *Staphylococcus* spp. and mutans streptococci were present in 66.6% and 53.3%, respectively (Table 1). Among the dentures positive for *Candida* spp., three species were identified. *C. albicans* was the most frequent yeast isolated, occurring in 23 dentures. *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* were encountered in 4 and 1 dentures, respectively (Table 1). The species identified from dentures positive for *Staphylococcus* spp. were *Staphylococcus aureus* and non-aureus (Table 1). *Streptococcus mutans* was the only species identified among dentures colonized with mutans streptococci, being found in 16 dentures (Table 1).

It was also observed that dentures were not simultaneously colonized by all species identified in the present study. The summary of species isolated from each denture is showed in Table 2

4. Discussion

The present study evaluated the *in vivo* effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of upper complete dentures and showed that a 3-min microwaving cycle at 650 W

Table 2 – Summary of identified species in dentures before microwave irradiation (n = 30).

Dentures from patients	Identified species					
	Candida spp.			Staphylococcus spp.		Mutans streptococci
	C. albicans	C. glabrata	C. tropicalis	Staphylococcus aureus	Non-aureus Staphylococci	Streptococcus mutans
1	+	-	-	-	-	+
2	+	-	-	+	-	+
3	+	-	-	-	+	+
4	+	-	-	-	+	-
5	+	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	+	+
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	+	+
10	-	-	-	+	-	-
11	+	-	-	-	-	+
12	+	-	-	-	+	-
13	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	+	-
15	+	+	+	-	+	+
16	+	+	-	+	-	+
17	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	+	-	+
19	-	-	-	-	+	+
20	+	-	-	+	-	+
21	+	-	-	-	+	-
22	+	-	-	+	-	-
23	+	-	-	+	-	+
24	+	-	-	-	-	+
25	+	-	-	-	+	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	+
29	+	+	-	+	-	-
30	+	-	-	-	+	+

+: presence and -: absence.

was capable to sterilize all dentures. This result was confirmed by the absence of microbiological growth in both selective and non-selective culture media after 48 h. Accordingly, Mima et al.²³ demonstrated *in vitro* sterilization of specimens contaminated with four pathogenic microorganisms (*C. albicans*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*) after exposure to microwaves for 3 min (650 W). Another *in vitro* study³⁰ verified sterilization of complete dentures contaminated with different *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida krusei* and *C. dubliniensis*) isolated from standard cultures or HIV-positive patients using the same microwave regimen (3 min/650 W). In addition, Dovigo et al.³¹ demonstrated *in vitro* that 3 min of microwaving at 650 W were effective in sterilizing dentures contaminated with *Staphylococcus aureus* and *P. aeruginosa*.

In the above-mentioned studies, the contaminated specimens were immersed in water during microwave irradiation, indicating that the effectiveness of microwave action seems to be related to this fact. According to Fitzpatrick et al.,³² sterilization by microwaves is only possible when the specimen is sufficiently moistened since the water acts on the coagulation of essential proteins of microorganisms during sterilization. In addition, other studies^{12,17,18} have shown that the immersion of contaminated acrylic resin specimens in

water during microwave irradiation is likely to favor the inactivation of microorganisms. The water osmotic pressure can disrupt microbial cells since the sterile distilled water, in which the contaminated specimens are immersed, is hypotonic in relation to the solute content within the cells.³³ This fact may contribute to the water flow into the cells, causing their disruption.³³ The existence of a relationship between these mechanisms and the results of the present study may be suggested.

Although several studies^{13,18,19,23} have demonstrated the lethal action of microwave irradiation on microorganisms, the mechanisms by which microwaving promotes their inactivation are not well understood. A recent study³⁴ has shown that microwaving *C. albicans* suspensions produced alterations on cell structural integrity, modifying cell membrane permeability and cell metabolism, which resulted in cell death. Some authors^{32,35} have attributed the lethal effect of irradiation on the metabolic activity of different microorganisms to the heat generated by the microwaves (thermal effects). However, other authors³⁶⁻³⁹ have suggested the existence of non-thermal effects on the metabolism of different microorganisms. Rosaspina et al.³⁹ observed alterations in microwaved microorganisms, which were not identified after thermal heat of the cells in water bath. The non-thermal effects could be

considered as an interaction between the electromagnetic field created by the microwaves and the cell molecules, resulting in molecular,^{37,38} mechanical³⁸ or selective heating mechanisms.⁴⁰ Although the nature of the action of microwaves has not been evaluated, the combination of lethal mechanisms described in the literature could explain the high susceptibility of microorganisms present in denture biofilms observed in the present study.

In the present study, when a 2-min microwave irradiation cycle (650 W) was used, the microbial counts on the complete dentures (cfu/mL) decreased in comparison to the initial collection. There was a significant decrease in the counts (cfu/mL) of *Candida* spp. ($P = 0.0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0.0178$), mutans streptococci ($P = 0.0047$) and microorganisms that grew in the non-selective culture medium ($P < 0.0001$). Therefore, denture sterilization was not observed, which indicates that a 1-min variation in the exposure time to the microwaves might have influence in the effectiveness of the method. The species that survived after irradiation were identified as *C. albicans*, non-aureus *Staphylococci* and *Streptococcus mutans*. The findings of the present study for 2-min exposure to microwave are consistent with those reported by Mima et al.²³ Those authors demonstrated disinfection of specimens contaminated with three bacterial species (*Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*) after 2 min of microwave irradiation at 650 W. In another study,⁴¹ there was microbiological growth on specimens contaminated with *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecium*, *Corynebacterium equi*, *Bacillus alvei* and *Bacillus globigii* after 2 min of microwave irradiation at maximum power. Goodson et al.⁴² evaluated clinically the effectiveness of 2-min microwave irradiation associated with a denture cleansing agent and found that although the acrylic complete dentures were not sterilized, they were effectively decontaminated. On the other hand, Mima et al.²³ verified that 2 min of microwaving at 650 W promoted sterilization of specimens contaminated with *C. albicans*. Webb et al.³⁴ also reported that dentures contaminated with *C. albicans* and *Streptococcus gordonii* were sterilized after microwave irradiation at 604 W for 2 min. Although some *in vitro* studies have demonstrated sterilization of acrylic specimens³⁹ and dentures³⁴ after 2 min of exposure to microwave irradiation, only disinfection was observed in the present investigation. It may be speculated that this fact is due to the use of dentures taken directly from the patients' mouth, where the microorganisms are originated from a mature biofilm. A biofilm is formed when unicellular organisms join and adhere to a solid surface and are involved by a polysaccharide matrix, which favors their proliferation and survival.^{2,43} A biofilm can be composed by either a single or multiple microbial species. It has been documented that biofilm cells are 1000-fold more resistant to antimicrobials and disinfectants than planktonic cells.² Due to the high resistance of biofilm microorganisms, 2 min of microwaving was not sufficient to cause their inactivation and microbiological growth was observed in both selective and non-selective media.

The initial collection performed on the dentures prior to exposure to microwave irradiation allowed determination of the microbial composition of the biofilms. *Candida* species (76.6%) were the most frequent among the 30 dentures taken from healthy patients, followed by *Staphylococcus* spp. (66.6%)

and mutans streptococci (53.3%). These results are in accordance to those of Baena-Monroy et al.,⁴⁴ who reported the presence of *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* on the inner surface of complete dentures taken from patients. *C. albicans* was isolated in 66.7% of the dentures, while *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* were isolated from 49.5% of the dentures. The present study also observed that the yeast species isolated from dentures were *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. Vander Abbeele et al.⁴⁵ confirmed that *C. albicans* (77.9%) was the most common yeast encountered in the dentures of patients, followed by *C. glabrata* (44.1%) and *C. tropicalis* (19.1%), respectively. Other studies^{34,46} have also confirmed the presence of *Candida*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* species colonizing the acrylic surfaces of dentures. Some of these studies related denture colonization with the development of systemic infections,⁴⁴ such as pneumonia, and local infections, such as denture-induced stomatitis.⁴⁴ These data demonstrate the need of establishing effective methods for denture disinfection in order to prevent cross-contamination between the dental office and the prosthetic laboratory.

5. Conclusions

The findings of this investigation suggest that microwave irradiation may be a potential treatment to prevent cross-contamination between the dental office and dental laboratory. Microwaving for 3 min was an effective method for clinical sterilization of complete dentures. Additionally, microwave irradiation for 2 min produced denture disinfection. Although properties of denture materials were not evaluated in this study, it seems that microwave exposure do not negatively affect some mechanical properties of acrylic resins.³⁴ Moreover, it has been demonstrated that a microwave regimen of 3 min at 650 W did not cause misfit of the acrylic base.⁴⁷ It is important to remember that repeated cycles of exposure to microwave irradiation was not tested in this research. Thus, the interpretation of the results must be made with caution since further studies should be performed to confirm the effects of repeated cycles on the integrity of dentures.

Acknowledgments

This research was supported by São Paulo Council of Research (FAPESP Grant Nos. 2005/02384-4 and 2005/02192-8).

REFERENCES

1. Brill N, Tryde G, Stoltze K, El Ghamrawy EA. Ecologic changes in the oral cavity caused by removable partial dentures. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1977;38:138-48.
2. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22.
3. Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible

- disease implications. *The Journal of the American Osteopathic Association* 2001;101:92-4.
4. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *Journal of Oral Rehabilitation* 2003;30:532-6.
 5. Zarb GA, Mackay HF. The partially edentulous patient. I. The biologic price of prosthodontic intervention. *Australian Dental Journal* 1980;25:63-8.
 6. Powell GL, Runnells RD, Saxon BA, Whisenant BK. The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1990;64:235-7.
 7. Henderson CW, Schwartz RS, Herbold ET, Mayhew RB. Evaluation of the barrier system, an infection control system for the dental laboratory. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1987;58:517-21.
 8. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1999;81:202-6.
 9. Polyzois GL, Zissis AJ, Yannikakis SA. The effect of glutaraldehyde and microwave disinfection on some properties of acrylic denture resin. *The International Journal of Prosthodontics* 1995;8:150-4.
 10. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1992;68:191-5.
 11. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Special Care in Dentistry* 2001;21:4-8.
 12. Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1999;81:207-14.
 13. Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization. *Journal of the American Dental Association* 1985;110:194-8.
 14. Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *Journal of Oral Rehabilitation* 1998;25:416-23.
 15. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology* 2005;22:168-76.
 16. Buerger R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahn S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica* 2008;66:174-80.
 17. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside relines resins. *The International Journal of Prosthodontics* 2005;16:616-20.
 18. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *The International Journal of Prosthodontics* 2006;19:288-93.
 19. 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. *Journal of Oral Rehabilitation* 2008;35:836-46.
 20. Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Guinesi AS, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET. Effect of microwave disinfection on the flexural strength of hard chairside relines resins. *Journal of Dentistry* 2005;33:741-8.
 21. Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2005;93:483-7.
 22. Seo BS, Vergani CE, Pavarina AC, Compagnoni MA, Machado AL. Influence of microwave disinfection on the dimensional stability of intact and relined acrylic resin denture bases. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2007;98:216-23.
 23. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relines resin. *Journal of Prosthodontics* 2008;17:312-7.
 24. Ribeiro DG, Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Flexural strength and hardness of relines and denture base acrylic resins after different exposure times of microwave disinfection. *Quintessence International* 2008;39:833-40.
 25. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:58-61.
 26. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontologica Scandinavica* 1990;48:27-36.
 27. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:329-34.
 28. Gaillot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P. Evaluation of CHROMagar *Staph. aureus*, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:1587-91.
 29. Hardie JM. Oral streptococci. In: Bergey DH, editor. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. p. 1054-63.
 30. 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.
 31. Dovigo, LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. *Journal of Prosthodontics*. Manuscript number JOPR-08-095; in press.
 32. Fitzpatrick JA, Kwao-Paul J, Massey J. Sterilization of bacteria by means of microwave heating. *Journal of Clinical Engineering* 1978;3:44-7.
 33. Pelczar Jr MJ, Chan EC, Krieg NR. Cultivation and growth of microorganisms. In: Pelczar Jr MJ, Chan EC, Krieg NR, editors. *Microbiology: concepts and applications*. New York: McGraw-Hill; 1993. p. 175-98.
 34. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DM. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses* 2007;50:140-7.
 35. Jung DK, Kaczmarek KA, Woodworth AG, Balasky G. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Applied and Environmental Microbiology* 1987;53:2133-7.
 36. Baysan A, Whitley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1998;79:454-8.
 37. Culkun KA, Fung DYC. Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. *Journal of Milk and Food Technology* 1975;38:8-15.
 38. Hiti K, Walochnik J, Fasching E, Haller-Schobert EM, Aspöck H. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea* 2001;20:467-70.
 39. Resaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios* 1994;78:55-9.
 40. Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, Miasa F, Tsukiji T. Effect of ionic strength on the inactivation of micro-organisms by microwave irradiation. *Letters in Applied Microbiology* 2000;31:52-6.

41. Sanborn MR, Wan SK, Bulard R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Applied and Environmental Microbiology* 1982;44:960-4.
42. Goodson LB, Glass RT, Bullard JW, Conrad RS. A statistical comparison of denture sanitation using a commercially available denture cleaner with and without microwaving. *General Dentistry* 2003;51:148-51.
43. Lamfon H, Al-Karaawi Z, Mccullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiology Letters* 2005;242:345-51.
44. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 2005;10:E27-9.
45. Vanden Abbeele A, De Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology* 2008;25:222-8.
46. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerodontology* 2003;20:84-7.
47. Consani RL, Mesquita MF, De Arruda Nobilo MA, Henriques GE. Influence of simulated microwave disinfection on complete denture base adaptation using different ask closure methods. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2007;97:173-8.

3.2 Capítulo 2

Photodynamic therapy for denture disinfection: A clinical investigation*

Daniela Garcia Ribeiro, DDS, MSc^a, Ana Cláudia Pavarina, DDS, MSc, PhD^b, Livia Nordi Dovigo, DDS, MSc^a, Ewerton Garcia de Oliveira Mima, DDS, MSc^a, Ana Lucia Machado, DDS, MSc, PhD^b, Vanderlei Salvador Bagnato, MSc, PhD^c, Carlos Eduardo Vergani, DDS, MSc, PhD^b

^aPostgraduate student, Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University, UNESP, Araraquara Dental School, São Paulo, Brazil.

^bAssociate Professor, Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University, UNESP, Araraquara Dental School, São Paulo, Brazil.

^c Associate Professor, Physics Institute, University of São Paulo, USP, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Full address of all authors:

Daniela Garcia Ribeiro– Av. Capitão Noray de Paula e Silva nº 715, Araraquara/SP, Brazil- CEP 14807-071.

Livia Nordi Dovigo– Av. Alfredo Coelho de Oliveira nº 338, casa 17, Araraquara/SP, Brazil- CEP 14801-020.

Ana Cláudia Pavarina– Av. Espanha nº 60- Apto. 91, Araraquara/SP, Brazil- CEP 14801-130.

Ana Lucia Machado– Av. Espanha nº 60- Apto. 152, Araraquara/SP, Brazil- CEP 14801-130.

Vanderlei Salvador Bagnato- Av. Trabalhador São-carlense nº 400, São Carlos/SP, Brazil- CEP 13566-590.

Carlos Eduardo Vergani– R. Bento Ferreira Luis, nº. 1814 (Casa 5), Araraquara/SP, Brazil- CEP 14806-590.

Corresponding author:

Dr. Ana Cláudia Pavarina

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

R. Humaitá nº 1680, Araraquara - São Paulo - Brazil - CEP 14801-903

Phone: #55#016#33016410; Fax: #55#016#33016406; e-mail: pavarina@foar.unesp.br

ScholarOne Manuscripts - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço: <http://mc.manuscriptcentral.com/lsm#refX>

0 Withdrawn Manuscripts

0 Invited Manuscripts

Lasers in Surgery & Medicine - Manuscript LSM-09-0139 (22-Jun-2009)	Delete
Lasers in Surgery & Medicine - LSM-09-0139 has been unsubmitted (22-Jun-2009)	Delete
Lasers in Surgery & Medicine - Manuscript LSM-09-0139 (22-Jun-2009)	Delete
Lasers in Surgery & Medicine - LSM-09-0139 has been unsubmitted (19-Jun-2009)	Delete
Lasers in Surgery & Medicine - Manuscript LSM-09-0139 (19-Jun-2009)	Delete

Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
LSM-09-0139	Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation [View Submitted] (Cover letter)	19-Jun-2009	22-Jun-2009	ED: Mallen, Beth Under Review

Concluído

Internet

Microsoft PowerPoint ...

ScholarOne Manuscript ...

PT 06:34

Abstract

Objective: The aim of this study was evaluate the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) for the disinfection of complete dentures. **Methods:** Biofilm samples were collected from dentures of 60 patients, who were randomly divided into four experimental groups (n=15 each): Groups I and II- patients had their maxillary denture sprayed with 50 mg/L and 100 mg/L of Photogem[®] suspension, respectively; Groups III and IV- patients had their maxillary denture treated with 50 mg/L and 100 mg/L of Photogem[®] gel, respectively. After 30 min of pre-irradiation, all dentures were exposure to blue LED light at 37.5 J/cm² (26 min). Denture samples were taken with sterile cotton swab, before (left side surfaces) and after (right side surfaces) PDT. All microbial material was diluted and plated on selective media for *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., mutans streptococci and a non-selective media. After incubation (48 h/ 37 °C), the number of colony-forming units (cfu/mL) was counted. Microorganisms which grew on selective media were identified using biochemical methods before and after PDT. The data were submitted to McNemar and Kruskal-Wallis tests ($\alpha = 0.05$). **Results:** Sterilization after PDT was observed in 40%, 47%, 53% and 60% of dentures, for Groups I, II, III and IV, respectively. When disinfection of the dentures occurred, PDT regimens eliminated more than 90% of microorganisms from dentures. **Conclusion:** This clinical study showed that PDT was effective for disinfecting dentures.

Key words: Photochemotherapy, Complete denture, Sterilization, Disinfection, Infection control.

Introduction

The potential risk of dentists acquiring or transmitting infectious diseases during clinical procedures has been a major concern in dental practice. A previous study¹ demonstrated that all materials sent from dental offices to the dental laboratories, including prostheses, were contaminated with different species of microorganisms. Therefore, prosthodontic patients can be considered a high-risk group for the transmission of infectious diseases as well as being susceptible of acquiring them.

Dental prostheses can act as a potential source of infection because pathogenic microorganisms are capable of adhering to and surviving on acrylic resin surfaces, promoting biofilm formation. Denture biofilms are complex structures similar to those found in dental plaque, except for the extensive presence of *Candida* spp.² Different species of oral and non-oral pathogens are associated with denture plaque, including *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. and *Actinomyces* spp.^{3,4} The presence of this microflora has been implicated in many local⁵ and systemic pathologies,^{3,4} such as caries, periodontal disease, mucosa inflammation, urinary tract infections, conjunctivitis, pneumonia, meningitis, abscess, septicemia and endocarditis.

The probable transmission of infectious agents between patients and dental staff has led an effort to find methods for decreasing the occurrence of cross-contamination in prosthodontic practice. An important procedure must be the disinfection of dentures both before they are sent to the laboratory and before insertion. Chemical agents have been widely applied to reduce microbial contamination of dentures.⁶ Nevertheless, some of the recommended denture-soaking solutions have been reported to change or damage the physical⁷ and mechanical properties⁸ of acrylic resins. Another alternative for denture disinfection may be microwave irradiation. Despite its effectiveness for inactivating microorganisms,⁹ many types of dentures, including removable partial dentures, cannot be disinfected by microwave, because they are constructed of a metal framework. Bearing in mind that the denture materials

should not be adversely affected by the disinfection process, many researchers have conducted studies to seek alternative therapies for denture decontamination.

Photodynamic therapy (PDT) seems to be a promising method for inactivating microorganisms. Until recently, the main application of PDT was to treat neoplasms¹⁰ and non-neoplastic¹¹ disorders. However, the use of this technique for the treatment of microbial infection¹² is also gaining interest due to the growing resistance to conventional antimicrobial agents. Many studies have shown PDT to be highly effective for inactivating viruses,¹³ bacteria¹⁴ and fungi.¹⁵ The basic principle of this approach is based on the irradiation of a compound known as a photosensitizer (PS) with a visible light, which causes cell death through the generation of reactive oxygen species (e.g. singlet oxygen). Several light sources have been applied to activate the PS. Although laser is the most commonly used light, another alternative light source for PDT is light-emitting diodes (LEDs). The LED device presents some advantages in comparison with laser light, such as: narrow-band non-coherent energy, lower cost and simple technology, being suitable for illuminating different targets. Moreover, there are different colors of LED light, whose radiations cover almost all the visible electromagnetic spectra.

Although the majority of studies have suggested antimicrobial PDT for the management of localized infections, this procedure may also emerge as a promising process for disinfection.¹⁶ Drinking water contaminated with a range of bacteria was disinfected using Rose Bengal, eosin and methylene blue associated with a halogen lamp.¹⁷ Furthermore, recent publications related to the use of PDT in blood decontamination.¹⁸ In dentistry, PDT can have important clinical applications such as disinfection of root canals, periodontal pockets, carious lesions and peri-implantitis sites.^{19,20}

Thus, this clinical study evaluated the effectiveness of PDT for disinfecting complete maxillary dentures worn by patients, as a potential method to avoid cross-contamination. The hematoporphyrin derivative Photogem[®] was selected as PS and it was associated with blue LED illumination.

Materials and Methods

Study population

Maxillary complete dentures of 60 patients, aged between 45-80 years, with a mean age 62.5 years, were included in this study. The patients, recruited from UNESP - São Paulo State University/ Araraquara Dental School, were invited by telephone to participate in the survey. They presented healthy oral mucosa, a good general health status and had been wearing their dentures for at least 6 months. Furthermore, one of the inclusion criteria was that the volunteers had not, or were not soaking dentures in a disinfectant solution. All the patients received verbal oral hygiene instructions. The examiners wore gloves, protective clothing, masks and eye protection during all clinical and laboratory procedures. After attending each patient and performing microbial culture, the operator's gloves were discarded and replaced with sterile gloves. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Araraquara Dental School/ UNESP – São Paulo State University and each patient provided written consent to participate in this study.

Clinical procedures

The sixty patients were randomly divided into four experimental groups (Group I, Group II, Group III and Group IV) of 15 subjects each. Blind investigators were responsible for the clinical procedures, such as: first denture biofilm collection, PDT procedures and second denture biofilm collection. Microbiological procedures were carried out by one examiner. The first collection of biological material (control) of each denture was performed before PDT treatment. Control samples were collected from the left half of all denture surfaces, which were vigorously rubbed for one minute with a sterile cotton swab. Denture biofilm samples were placed in tubes containing 4.5 mL of sterile saline solution.

After the first collection, Photogem[®] (Photogem, Moscow, Russia) was used to photosensitize the denture biofilms. It is important to mention that

Photogem[®] was the PS selected for the purposes of this investigation, because of its effectiveness in inactivating different types of microorganisms.^{14,21,22} Furthermore, the hematoporphyrin derivatives were the first authorized by the U.S. Food and Drug Administration for clinical use in PDT.^{12,23} Photogem[®] was applied to the dentures according to the experimental groups: Groups I and II- patients had their maxillary denture sprayed with 50 mg/L and 100 mg/L of Photogem[®] suspension, respectively; Groups III and IV- patients had their maxillary denture treated with 50 mg/L and 100 mg/L of Photogem[®] gel, respectively. Then, each denture was individually placed in a plastic bag and left in the dark for 30 min (pre-irradiation). After this, all dentures were placed inside a LED device (Fig. 1) designed by the “Physics Institute” (University of São Paulo, USP, São Carlos, SP, Brazil). This system is composed of twenty-four royal blue LEDs (LXHL-PR09, Luxeon[®] III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) uniformly distributed throughout the device and contains three air coolers to avoid heating the samples. The LED device covered the wavelength range from 440 nm to 460 nm, with maximum emission at 455 nm. The intensity of light delivered was 24 mW/cm². The dentures were illuminated for 26 min (37.5 J/cm²). After PDT procedures, a second collection (right side surfaces) of biological material from each of the sixty dentures was made as described for the first collection.

Microbiological analysis

The saline tubes of before and after PDT were first shaken for one minute to disperse the cells from the swab. All microbial material was diluted (10^{-1} to 10^{-3}) in saline solution and aliquots of each dilution (25 μ L) were plated on selective media for *Candida* spp. (CHROMagar), *Staphylococcus* spp. (Mannitol Salt Agar), mutans streptococci (SB20) and a non-selective media (Mueller Hinton). The plates were incubated aerobically at 37 °C for 48 h, except for mutans streptococci, which was incubated in candle jars. After incubation for 48 h, microbial colony counts of each plated denture were quantified using a digital colony counter (Phoenix CP 600 Plus, Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos

Científicos Ltd, Araraquara, SP, Brazil). Then, the colony forming units per milliliter (cfu/mL) were determined.

Conventional biochemical methods were used to identify the microorganism cultures. *Candida* species were identified by CHROMagar *Candida* (Probac/Brazil) media and confirmed by biochemical tests (germ-tube tests, chlamydospore formation, assimilation and fermentation of sugars).^{24,25} Moreover, an appropriate identification test was required to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. All *C. albicans* samples identified by CHROMagar *Candida* were submitted to the thermotolerance test (growth at 42 °C and 45 °C).²⁶ *Staphylococcus* spp. isolates were subcultured onto Mannitol Salt Agar media. The isolate, which formed a yellow colony, referred to as *Staphylococcus aureus*, was plated on CHROMagar *Staphylococcus*. For *Staphylococcus aureus*, this culture media provides the growth of purple colonies. The *Staphylococcus aureus* strains were identified by the coagulase test using rabbit plasma.²⁷ Mutans streptococci were identified by observing the physiological characteristics and using biochemical tests (fermentation of mannitol, sorbitol, melibiose and raffinose, hydrolysis of arginine, resistant to bacitracin and hydrogen peroxide) produced in accordance with Bergey's Manual.²⁸

Data analysis

The sterilization of the denture was accepted when no evidence of growth was observed for all culture media after PDT treatment. These results were categorized as sterilized dentures and non-sterilized dentures. Statistical analysis was performed by the McNemar test ($\alpha = 0.05$). PDT was considered effective for disinfection when it resulted in 90% reduction of microorganisms on dentures. The percentage of reduction was calculated by subtracting the total cfu/mL value obtained on the second denture biofilm collection from the total cfu/mL value obtained on the first denture biofilm collection. The Kruskal-Wallis test was used to compare the PDT effectiveness for denture disinfection among the four

experimental groups. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Effectiveness of PDT

Sterilization after PDT was observed in 40%, 47%, 53% and 60% of dentures, for Groups I, II, III and IV, respectively. These values were calculated based on the number of dentures which showed no colony growth on non-selective media. When the liquid formulation of Photogem[®] was used at 50 mg/L (Group I), PDT treatment promoted a significant elimination only for *Staphylococcus* spp. When the concentration was increased to 100 mg/L (Group II) it produced significant inactivation of *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. and mutans streptococci. The results of Group III showed that the gel formulation of Photogem[®] at 50 mg/L significantly eliminated *Staphylococcus* spp. and mutans streptococci from dentures. A significant inactivation of both these microorganisms and *Candida* spp. was achieved with the gel concentration of 100 mg/L (Group IV).

When denture sterilization did not occur, disinfection was observed, since a significant decrease in colony counts was found. The four PDT regimens eliminated over 90% of microorganisms from dentures. Although a reduction of microbial population was observed, statistical analysis confirmed no significant difference among the four experimental groups for disinfection of the dentures. The p-values obtained were $P = 0.77$ for *Candida* spp., $P = 0.82$ for *Staphylococcus* spp., $P = 0.76$ for mutans streptococci and $P = 0.95$ for microorganisms grown on non-selective media. The percentages of reduction in microorganisms obtained in each experimental group are shown in Table 1.

Microbiological identification of isolates

Cultures from non-selective media showed substantial microbial growth for all dentures belonging to Groups I, II, III and IV, before PDT procedures. The

results obtained with selective media (Table 2) revealed that *Candida* spp. was the most frequent microorganism (60.0%) in dentures, followed by mutans streptococci (53.3%) and *Staphylococcus* spp. (48.3%). Among the dentures positive for *Candida* spp., three species were identified. *C. albicans* was the most frequent yeast isolated, occurring in 35 dentures while *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* were found in 09 and 02 dentures, respectively (Table 2). The species identified from dentures positive for *Staphylococcus* spp. were *Staphylococcus aureus* and non-aureus *Staphylococci* (Table 2). *Streptococcus mutans* was the only species identified among dentures colonized with mutans streptococci, which was found in 32 dentures (Table 2).

The identity of the various species recovered from each denture, before and after PDT procedures, is described in Fig. 2. It was observed that dentures were not simultaneously colonized by all species identified in the present study.

Discussion

The current in vivo study investigated the effectiveness of PDT, using Photogem[®] in association with blue LED, for disinfection of complete dentures and observed that sterilization after PDT was achieved in 40%, 47%, 53% and 60% of dentures, for Groups I, II, III and IV, respectively. These results from non-selective media showed that the occurrence of sterilization varied according to PDT treatments. The highest frequency of sterilized dentures was observed with the Photogem[®] in gel formulation, both at 50 mg/L and 100 mg/L, resulting in 53% and 60% of sterilization, respectively. Accordingly, experimental examinations^{29,30,31} have revealed that the gel formulation can be more efficient than the liquid for disinfection purposes. Gomes et al.²⁹ showed that chlorhexidine gluconate gel was more efficient than the liquid presentation at equivalent concentrations against selected endodontic microorganisms. Another investigation³⁰ also proved that chlorhexidine in gel form eliminated *Staphylococcus aureus* and *C. albicans* isolated from infected root canals. According to the research of Paolantonio et al.³¹ filling the internal implant cavity with chlorhexidine gel resulted in a significant reduction in the total bacterial

count and it proved to have a long-lasting antimicrobial effect when compared with chlorhexidine solution. The above-mentioned studies suggested that the higher effectiveness of the gel formulation was due to the gel keeping the chemical substance in contact with the microorganisms for a longer time than the liquid formulation. Photogem[®] gel being capable of remaining on the denture surfaces during pre-irradiation and illumination procedures may explain the better results obtained for Groups III and IV. It is possible that the constant contact of denture biofilm with the PS gel favored the photosensitization of microorganisms, improving the effectiveness of PDT.

In the cases in which PDT did not sterilize the dentures, a substantial reduction in the counts of viable microorganisms was observed. This disinfection was observed after the four PDT treatments, since they all significantly reduced over 90% of the microorganisms from dentures. Although the present investigation was the first to describe the clinical use of PDT for denture disinfection, the results presented here may be comparable with researches that applied PDT for clinical disinfection in dentistry. Giusti et al.²³ evaluated the use of Photogem[®] in association with red LED light for decontaminating carious bovine dentin and observed that the initial number of bacteria was reduced by more than 90% after PDT treatment. In another study,³² the subgingival plaque samples from patients were exposed to laser in the presence of toluidine blue O (TBO) and achieved significant reductions (over 90%) in the viability of aerobic and anaerobic organisms. Dörtbudak et al.¹⁹ showed that the application of TBO and laser for implant surface disinfection was capable of significantly reducing (2 log steps on an average) the initial values for the three bacteria groups tested.

In addition to the studies already mentioned, the results also may be corroborated by the findings of several *in vitro* studies.³³⁻³⁶ These aforementioned investigations showed that bacterial and yeast species are susceptible to PDT, including those found in dentures worn by edentulous patients. Soares et al.³⁶ obtained a significant reduction in the growth of planktonic *C. albicans*, *C. tropicalis* and *Candida parapsilosis* cultures after PDT mediated by TBO with LED light. Another *in vitro* study³³ demonstrated the possibility of

photosensitizing *C. albicans* and *C. glabrata* by light-induced inactivation by using Photofrin[®] and an Hg arc lamp. According to Tegos et al.³⁵ the use of a chlorin (e6) conjugate in conjunction with a diode laser efficiently killed microbial suspensions of *Staphylococcus aureus*. The susceptibility of one *Streptococcus mutans* strain was verified by using a dental photopolymerizer in association with Rose Bengal dye.³⁴ The results of these mentioned studies are consistent with those of the present study, which also observed that PDT caused significant reduction of microorganisms from dentures.

Besides the studies described above, some investigations evaluated the photodynamic effects on biofilms formed in vitro, in order to simulate the in vivo conditions. Researches concerning biofilms bring relevant data since most of the microorganisms are found in nature, living in microbial communities on different surfaces.³⁷ Recent studies showed that biofilms of *C. albicans*,³⁸ *Staphylococcus aureus*³⁹ and *Streptococcus mutans*⁴⁰ may be inactivated by using a variety of PS and light sources. In the present study, dentures colonized with microbial biofilm composed of different species (from non-selective media) were sterilized after PDT regimes. These results confirm the possibility of using PDT for inactivating microorganisms organized in biofilm communities. Nevertheless, not all dentures were sterilized after PDT and one possible explanation for these findings could be the functional and structural characteristics of biofilm-grown cells,^{37,39} which may reduce their sensitivity to photodynamic damage. Developing biofilms have been associated mainly with the presence of extracellular matrix.^{37,39} The latter is known to interact physically with antimicrobial agents and then contribute to the resistance to these drugs.⁴¹ It has also been suggested that the production of extracellular material blocks the diffusion of the PS through the biofilm, thus reducing the susceptibility of the adhered organisms to photokilling.³⁹ It is also important to report that photodynamic inactivation is based on light-induced oxidation reactions that lead to cell death. Three critical elements are required for the photodynamic process to occur: a drug (PS) that can be activated by light, light and oxygen.⁴² An activated PS can transfer energy directly to oxygen, generating the reactive singlet oxygen.⁴³ This molecule can react against a wide

range of cell targets, including membrane lipids, cytoplasmic enzymes and nucleic acids.⁴² In PDT, the degree of photoinactivation will probably be equivalent to the amount of singlet oxygen produced. The use of high PS concentrations and light fluences can increase the amount of reactive oxygen formed and promote more oxidative damage in the biological targets. Demidova et al.⁴⁴ showed that a high amount of singlet oxygen is needed to kill a *Candida* cell. This fact has been attributed to the large size of the *Candida* cell and the presence of a nuclear membrane that may present an additional barrier to PS penetration.^{44,45} The results of the present study confirm that a high concentration of PS is required to inactivate *Candida* spp. since a significant inactivation was only observed after using 100 mg/L of Photogem[®].

The results with regard to the microbiological identification of isolates from dentures revealed the biofilm composition before and after PDT procedures. The initial collection showed that *Candida* species (60.0%) were the most frequent among the 60 dentures taken from healthy patients, followed by mutans streptococci (53.3%) and *Staphylococcus* spp. (48.3%). These results corroborate those of Ribeiro et al.⁹, who recently found the same three species in maxillary dentures, and *Candida* spp. presented the highest frequency of appearance (76.6%). Another study⁴⁶ reported the presence of *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* on the inner surface of complete dentures taken from patients. *C. albicans* was isolated in 66.7% of the dentures, while *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* were isolated from 49.5% of the dentures. The present study observed that the yeast species isolated from dentures were *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. Vanden Abbeele et al.⁴⁷ confirmed that *C. albicans* (77.9%) was the commonest yeast found on patients' dentures, followed by *C. glabrata* (44.1%) and *C. tropicalis* (19.1%), respectively. After PDT treatments, the species were identified as *C. albicans*, *C. glabrata*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Some investigations^{3,48} have related the presence of *Candida*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* species on dentures to the development of systemic infections,⁴⁸ such as pneumonia, and local infections, such as denture-induced stomatitis.⁴⁶

Although the present research showed disinfection of all the dentures, the persistence of pathogenic microorganisms on dentures after disinfection procedures may be cause for concern. Preferably, these procedures should be efficient for completely eliminating microorganisms, allowing denture sterilization and assuredly preventing cross-contamination between the dental office and dental laboratory personnel. Thus, further research is needed to determine an effective combination of PS concentration with light fluence for preventing cross-infection in dental practice.

In conclusion, this clinical study showed that PDT was effective in disinfecting dentures since the four treatments inactivated over 90% of microorganisms from dentures. When the dentures were sterilized, the gel formulation of Photogem[®] was more efficient when compared with the liquid form for photosensitizing denture biofilm. Nevertheless, the results must be interpreted with caution because the survival of any microorganism on the denture after PDT could be an infection hazard for dental staff and patients. Thus, to establish an effective infection control program it is important not only to decrease the number of microorganisms, but eliminate them from dentures. For this reason, a possible future direction in research to improve PDT effectiveness may be the evaluation of higher Photogem[®] concentrations in order to achieve sterilization of all dentures evaluated.

Acknowledgments

This research was supported by São Paulo Council of Research (FAPESP Grant No. 2005/02192-8).

References

1. Powell GL, Runnells RD, Saxon BA, Whisenant BK. The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories. *J Prosthet Dent* 1990;64:235-7.
2. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent* 1998;26:299-304.

3. Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. *J Am Osteopath Assoc* 2001;101:92-4.
4. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil* 2003;30:532-6.
5. Zarb GA, Mackay HF. The partially edentulous patient. I. The biologic price of prosthodontic intervention. *Aust Dent J* 1980;25:63-8.
6. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent* 1999;81:202-6.
7. Shen C, Javid NS, Colaizzi FA. The effect of glutaraldehyde base disinfectants on denture base resins. *J Prosthet Dent* 1989;61:583-9.
8. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent* 1992;68:191-5.
9. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Spolidorio DM, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: A randomized clinical study. *J Dent*. Manuscript number JJOD 1408 1-7 (2009); in press.
10. Brow SB, Brown EA, Walker I. The present and the future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2004;5:497-508.
11. Mennel S, Barbazetto I, Meyer CH, Peter S, Stur M Ocular photodynamic therapy-standard applications and new indications (part 1). Review of the literature and personal experience. *Ophthalmologica* 2007;221:216-26.
12. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28.
13. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:406-11.
14. Venezia FR, DiVincenzo C, Sherman R, Reichman M, Origitano TC, Thompson K, Reichman OH. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. *J Infect Dis* 1985;151:166-9.

15. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* 1992;71:33-46.
16. Wilson M. Light-activated antimicrobial coating for the continuous disinfection of surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:782-4.
17. Kuznetsova NA, Makarov DA, Kaliya OL, Vorozhtsov GN. Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection. *J Hazard Mater* 2007;146:487-91.
18. Wainwright M, Mohr H, Walker WH. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J Photochem Photobiol B* 2007;86:45-58.
19. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:104-8.
20. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J* 2003;48:146-55.
21. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990;5:281-93.
22. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol* 1992;55:89-96.
23. Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersen K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, Bagnato VS. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg* 2008;26:281-7.
24. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996;34:58-61.
25. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990;48:27-36.
26. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36:329-34.

27. Gaillot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P. Evaluation of CHROMagar *Staph. aureus*, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. J Clin Microbiol 2000;38:1587-91.
28. Hardie JM. Oral streptococci. In: Bergey DH (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimor: Williams & Wilkins; 1986. p.1054-63.
29. Gomes BPF, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants (BES Spring Meeting Abstract). J Endod 1999;25:299.
30. Vianna ME, Gomes BPF, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2004;97:79-84.
31. Paolantonio M, Perinetti G, D'Ercole S, Graziani F, Catamo G, Sammartino G, Piccolomini R. Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel. J Periodontol 2008;79:1419-25.
32. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. J Periodontal Res 1993;28:204-10.
33. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2000-6.
34. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 2005;50:353-9.
35. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorine(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1402-10.

36. Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, Pinotti M, Cisalpino PS. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B* 2009;94:65-70.
37. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
38. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4288-95.
39. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:299-305.
40. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:324-30.
41. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385-94.
42. Henderson B, Dougherty TJ. How does the photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992;55:145-57.
43. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-50.
44. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2329-35.
45. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2001;144:274-8.

46. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:E27-9.

47. Vanden Abbeele A, De Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology* 2008;25:222-8.
48. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerodontology* 2003;20:84-7.

Table 1- Percentage of reduction in microorganisms obtained in each experimental group according to the culture media.

Group	Percentage of reduction calculated for each media (%)			
	CHROMagar [*]	Manitol Salt Agar ^{**}	SB20 [†]	Mueller Hinton [‡]
I	98.7	98.7	98.6	99.6
II	99.5	92.5	99.9	99.9
III	99.2	98.5	99.4	99.8
IV	90.2	91.2	99.9	99.8

^{*}CHROMagar was used for *Candida* spp. growth; ^{**}Manitol Salt Agar was used for *Staphylococcus* spp. growth; [†]SB20 was used for mutans streptococci growth; [‡]Mueller Hinton was employed for the growth of any microorganism.

Table 2- Prevalence of the different species identified in 60 maxillary dentures before PDT procedures.

Identified species	Dentures (total= 60)	
	Number	%
<i>Candida</i> spp.	36	60.0
<i>C. albicans</i>	35	58.3
<i>C. glabrata</i>	09	15.0
<i>C. tropicalis</i>	02	3.3
<i>Staphylococcus</i> spp.	29	48.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	38.3
non-aureus <i>Staphylococci</i>	06	10.0
Mutans streptococci	32	53.3
<i>Streptococcus mutans</i>	32	53.3

Figure 1



Figure 2

Groups evaluated	Dentures from patients	Species recovered	
		Before PDT	After PDT
Group I	01	Sa	nd
	02	Ca, Cg, Sa, Ms	Ca, Cg, Sa, Ms
	03	nd	nd
	04	Ca	Ca
	05	Sa, Ms	Ms
	06	Ca, Ms	nd
	07	Ca	nd
	08	Ca, Ms	Ca, Ms
	09	Ca, Cg, Sa, Ms	Ca, Sa, Ms
	10	Sa, Ms	Ms
	11	nd	nd
	12	Ca, Sa, Ms	nd
	13	Ca, Sa, Ms	Ca, Sa, Ms
	14	nd	nd
	15	Ca	Ca
Group II	16	Ca, Ms	nd
	17	Ca, Ms	nd
	18	Ca, Ms	Ca
	19	Ms	nd
	20	Sa	nd
	21	Ca, Cg, Ms	Cg
	22	Sa	Sa
	23	Ca, Sa, Ms	Ca, Sa, Ms
	24	Ms	Ms
	25	nd	nd
	26	Ca, Sa	Ca, Sa
	27	Ca, n-Sa, Ms	Ca, Ms
	28	Cg	nd
	29	Sa, Ms	nd
	30	Ca, n-Sa	nd
Group III	31	Ca, Ms	nd
	32	nd	nd
	33	Ca, Sa	nd
	34	Ca, n-Sa, Ms	nd
	35	Ms	nd
	36	Ca, Cg, Sa, Ms	Ca, Cg, Ms
	37	Ca	Ca
	38	Ms	nd
	39	Ca, Sa, Ms	Ca, Sa, Ms
	40	nd	nd
	41	nd	nd
	42	Ca, n-Sa, Ms	Ca
	43	Sa	Sa
	44	Ca, Cg, Ms	Ca, Cg, Ms
	45	Ca, Sa	Ca, Sa
Group IV	46	Ca, Ct, Sa	Sa
	47	Ca, Cg, Sa, Ms	Ca, Cg, Ms
	48	Sa	nd
	49	Ca, Sa	Ca, Sa
	50	Ms	nd
	51	Ca, n-Sa	nd
	52	Ms	nd
	53	Ca, Ms	nd
	54	nd	nd
	55	Ca, Cg, Sa	Ca, Cg
	56	Ca, Cg, Ms	Ca, Cg, Ms
	57	n-Sa, Ms	nd
	58	Ca, Sa, Ms	Ca, Ms
	59	nd	nd
	60	Ca	nd

*Ca= *C. albicans*; Cg= *C. glabrata*; Ct= *C. tropicalis*; Sa= *Staphylococcus aureus*, n-Sa= non-aureus *Staphylococci*, Ms= *Streptococcus mutans*, nd= not detected.

Legend to Illustrations

Fig. 1- LED device.

Fig. 2- Summary of species from 60 dentures, identified before and after PDT procedures.



4 Discussão

Os dados obtidos por esta investigação bem como a análise estatística estão apresentados nos Apêndices 1 e 2. Além disso, a tese apresenta Anexos que foram necessários para o desenvolvimento da metodologia proposta.

A inativação dos micro-organismos presentes na superfície e nos poros das próteses dentárias é fundamental para que haja um efetivo controle da infecção cruzada entre pacientes, cirurgiões-dentistas e técnicos de laboratório. As próteses devem ser desinfetadas pelos cirurgiões-dentistas ao serem enviadas ao laboratório. Da mesma maneira, após os procedimentos laboratoriais, os técnicos de laboratório devem realizar uma nova desinfecção das próteses, uma vez que estas podem ter sido contaminadas durante os procedimentos de acabamento e polimento³⁸.

Este estudo avaliou in vivo a efetividade da irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais superiores e verificou que a utilização de 3 minutos (650 W) resultava na esterilização de todas as próteses avaliadas. Esse resultado foi constatado pela ausência de crescimento microbiológico nos meios de cultura seletivos e não-seletivos, após 48 horas. Os achados da nossa investigação estão de acordo com os de Mima et al.⁴³, que verificaram esterilização de corpos-de-prova contaminados com quatro micro-organismos patogênicos (*S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *Bacillus subtilis*) após exposição às micro-ondas durante 3 minutos (650 W). Outro estudo⁶⁵ in vitro verificou esterilização de próteses totais contaminadas por diferentes espécies do micro-organismo *Candida* (*C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis*), isoladas de culturas padrão e de pacientes HIV positivo, após 3 minutos de irradiação por micro-ondas a 650 W. Além disso, os resultados da investigação in vitro de Dovigo et al.²⁵ demonstraram que 3 minutos (650 W) de irradiação também foram efetivos na esterilização de próteses contaminadas com as espécies bacterianas *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os estudos mencionados utilizaram, durante a irradiação, a imersão em água das amostras contaminadas, indicando que a efetividade da ação das

micro-ondas parece estar relacionada a esse fato. Segundo Fitzpatrick et al.²⁶, a esterilização por micro-ondas é possível quando a amostra é umedecida suficientemente, uma vez que a água atua na coagulação de proteínas dos micro-organismos durante a esterilização. Além disso, outras pesquisas^{23,45,68} revelaram que a imersão das amostras em água provavelmente favorece a inativação dos micro-organismos submetidos à irradiação por micro-ondas. As células dos micro-organismos podem ser rompidas por meio da pressão osmótica da água, pois a água destilada estéril, na qual as amostras contaminadas são imersas, é hipotônica em relação ao conteúdo de solutos no interior das células, o que favorece o fluxo de água para dentro delas, rompendo-as⁵⁵. Sugerimos existir a relação dos mecanismos descritos com os resultados obtidos em nosso estudo.

Apesar de vários estudos^{43,45,59,68} evidenciarem a ação letal das micro-ondas sobre os micro-organismos, os mecanismos pelos quais elas promovem inativação dos mesmos não estão bem estabelecidos. Em um recente¹³ estudo, foi observado que a irradiação de suspensões de *C. albicans* por micro-ondas produziu alterações na integridade estrutural das células, modificando a permeabilidade da membrana celular e seu metabolismo, resultando em morte celular. Alguns autores^{26,37} atribuíram o efeito letal da irradiação sobre a atividade metabólica de diferentes micro-organismos ao calor gerado pelas micro-ondas (efeitos térmicos). Os resultados de um estudo prévio²⁶ demonstraram que a esterilização obtida com a irradiação por micro-ondas foi devida a um efeito puramente térmico, já que a inativação dos micro-organismos ocorreu pelo vapor produzido durante a irradiação em recipientes selados. Entretanto, outros pesquisadores^{5,20,35,60} sugeriram a existência de efeitos não-térmicos sobre o metabolismo de diferentes micro-organismos. Rosaspina et al.⁶⁰ observaram alterações em micro-organismos após irradiação por micro-ondas, as quais não foram constatadas após o aquecimento térmico das células em banho de água. Os efeitos não-térmicos poderiam ser considerados uma interação entre o campo eletromagnético das micro-ondas e as moléculas das células, resultando em mecanismos moleculares^{20,35}, mecânicos³⁵ ou de aquecimento seletivo⁸¹. Alguns autores⁶⁰ afirmaram acreditar que, quando as micro-ondas entram em contato com

materiais contendo água, como as células microbianas, esse líquido poderia absorver a radiação, fazendo as células vibrarem, o que causaria um aumento de sua energia interna o suficiente para aumentar ao extremo a temperatura celular. Como resultado, ocorreriam alterações morfológicas nas células e sua consequente desintegração. Segundo Hiti et al.³⁵, as células biológicas são caracterizadas por apresentarem alto conteúdo de água na sua composição, justificando sua sensibilidade à irradiação por micro-ondas. Além disso, dependendo do meio circundante dos micro-organismos e da concentração dos compostos iônicos presentes no citoplasma celular, algumas células poderiam ser aquecidas seletivamente pelas micro-ondas, o que geraria no seu interior uma temperatura maior que no meio circundante^{49,81}. Isto poderia explicar, parcialmente, o efeito bactericida da irradiação por micro-ondas⁴⁹. Além do mais, tem sido sugerido que a energia gerada pelas micro-ondas poderia causar uma oscilação muito rápida da célula microbiana. Consequentemente, o limite elástico da estrutura celular poderia ser excedido, causando a sua ruptura. Embora a natureza da ação das micro-ondas não tenha sido avaliada, a combinação dos mecanismos letais descritos na literatura poderia explicar a alta susceptibilidade dos micro-organismos oriundos de biofilmes observada neste estudo.

Quando utilizada a irradiação por micro-ondas durante 2 minutos (650 W), foi possível notar redução na contagem dos micro-organismos presentes nas próteses, em comparação com a coleta inicial. Foi observada redução significativa no valor de ufc/mL de *Candida* spp. ($P = 0,0062$), *Staphylococcus* spp. ($P = 0,0178$), mutans streptococci ($P = 0,0047$) e dos micro-organismos que cresceram no meio não-seletivo ($P < 0,0001$). Dessa forma, a esterilização das próteses não foi observada, evidenciando que a variação de 1 minuto no tempo de exposição às micro-ondas pode ter influência na efetividade do método. As espécies resistentes às micro-ondas foram identificadas como *C. albicans*, não *aureus* *Staphylococcus* e *S. mutans*. Os resultados observados na presente investigação, após 2 minutos de exposição às micro-ondas, concordam com os encontrados pelo estudo de Mima et al.⁴³. Os autores demonstraram desinfecção de corpos-de-prova contaminados com três micro-organismos (*S. aureus*, *B.*

subtilis e *P. aeruginosa*) após 2 minutos (650 W) de irradiação por micro-ondas. Em outro estudo⁶³, foi verificado que amostras contaminadas por *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecium*, *Corynebacterium equi*, *Bacillus alvei* e *Bacillus globigii* apresentaram crescimento microbiano após 2 minutos de irradiação por micro-ondas utilizando potência máxima. A investigação de Goodson et al.³¹ avaliou clinicamente a efetividade da irradiação por micro-ondas durante 2 minutos quando utilizada em associação com um agente de limpeza. Os autores observaram que próteses totais acrílicas foram, embora não esterilizadas, efetivamente descontaminadas. Por outro lado, a utilização de 2 minutos (650 W) de exposição às micro-ondas promoveu esterilização de corpos-de-prova contaminados com *C. albicans*, como verificado no estudo de Mima et al.⁴³. Da mesma forma, Webb et al.⁸³ observaram que próteses contaminadas com *C. albicans* e *S. gordonii* foram esterilizadas, após irradiação a 604 W, no período de 2 minutos. Embora estudos in vitro tenham constatado esterilização de corpos-de-prova⁴³ e próteses⁸³ após 2 minutos de irradiação por micro-ondas, em nossa investigação foi observada desinfecção. Sugere-se que tenha ocorrido apenas desinfecção por causa da utilização de próteses oriundas da cavidade bucal de pacientes, onde os micro-organismos são originários de um biofilme maduro. Um biofilme é formado quando organismos unicelulares se unem e se aderem a uma superfície sólida e são envolvidos por uma matriz de polissacarídeos, o que favorece a proliferação e a sobrevivência dos mesmos^{18,40}. Na constituição de um biofilme pode ser encontrada única ou múltipla espécie de micro-organismos. Já foi documentado que, quando células fazem parte de um biofilme, elas se tornam até 1.000 vezes mais resistentes a antimicrobianos e desinfetantes, em comparação com as células planctônicas¹⁸. Em razão dessa alta resistência dos micro-organismos oriundos de um biofilme, pôde-se constatar que 2 minutos de irradiação por micro-ondas não foi suficiente para inativá-los, observando-se tanto o crescimento nos meios seletivos quanto no meio não-seletivo. Outro fator relevante a ser citado é a maior área de contato da prótese total, associada às irregularidades presentes na sua superfície, a qual pode ter permitido uma maior aderência de micro-organismos. Segundo Verran, Maryan⁷⁵ (1977), um aumento

na rugosidade superficial de resinas acrílicas facilita a retenção do micro-organismo *C. albicans*. Conclusão semelhante foi obtida por Waltimo et al.⁸² ao compararem a aderência de *C. albicans* à superfície de polimetilmetacrilato e à superfície de compósito de fibra de vidro utilizado em próteses totais, pois os resultados demonstraram que a densidade média de leveduras na superfície de matriz polimérica foi significativamente maior do que sobre a superfície da fibra. Assim, após 48 horas de incubação a 37°C, a esterilização não foi alcançada para todas as próteses que foram irradiadas, durante 2 minutos, nesta investigação.

É importante ressaltar que o tempo de 3 minutos de desinfecção por micro-ondas já foi investigado por alguns estudos *in vitro*, considerando as propriedades das resinas constituintes das próteses. As pesquisas mostraram que esse tempo não promove efeitos adversos sobre resinas para base de prótese e para reembasamento. Ribeiro et al.⁵⁸ avaliaram o efeito de 3 minutos (650 W) na resistência à flexão e na dureza de quatro materiais reembasadores e de uma resina termopolimerizável. Os achados da investigação demonstraram que as propriedades mecânicas dos materiais avaliados não foram negativamente alteradas. Para avaliar o efeito da desinfecção por micro-ondas (3 minutos/500 W) sobre a dureza Shore A, Pavan et al.⁵³ utilizaram corpos-de-prova de quatro materiais reembasadores *soft*. Não foram observadas alterações nos valores de dureza obtidos antes e depois da irradiação por micro-ondas. Outro estudo de Pavan et al.⁵² avaliou a influência das micro-ondas (3 minutos/500 W) sobre a estabilidade dimensional de corpos-de-prova que simulavam bases de próteses. Os autores não observaram alteração dimensional nas bases que foram irradiadas por esse tempo. A proposta do estudo de Consani et al.¹⁷ foi determinar o efeito da desinfecção por micro-ondas (3 minutos/650 W) na adaptação de bases de dentaduras superiores confeccionadas por dois métodos. Foi observado que, para algumas bases, um ciclo de irradiação por micro-ondas aumentava sua adaptação, enquanto para outras não houve qualquer alteração. Considerando os resultados dos estudos citados e os obtidos por esta investigação, é possível sugerir que o tempo de 3 minutos seja adequado tanto para promover a inativação dos micro-

organismos encontrados nas próteses como para não causar efeitos adversos em suas propriedades.

Além das micro-ondas, nossa investigação também avaliou a efetividade da PDT associando o FS Photogem[®] e luz azul de LED para a desinfecção de próteses totais. Após a terapia, foi observada esterilização de 40%, 47%, 53% e 60% das próteses pertencentes aos Grupos I, II, III e IV, respectivamente. Esses resultados foram obtidos pela análise dos meios não-seletivos, quando nestes não foi observado crescimento de micro-organismos. A porcentagem de próteses esterilizadas variou de acordo com o tipo de tratamento empregado. A maior frequência de próteses esterilizadas foi observada após utilização de Photogem[®] na formulação gel, tanto 50 mg/L como 100 mg/L, resultando em 53% e 60% de esterilização, respectivamente. Alguns estudos^{30,50,77} também relataram maior eficiência da formulação em gel para desinfecção do que da formulação líquida. Gomes et al.³⁰ comprovaram que o gluconato de clorexidina em gel foi mais efetivo do que o líquido, ambos nas mesmas concentrações, para a inativação de micro-organismos de origem endodôntica. Uma outra investigação⁷⁷ também demonstrou que a clorexidina em gel eliminava *S. aureus* e *C. albicans* isolados de canais radiculares infectados. De acordo com a pesquisa de Paolantonio et al.⁵⁰, o contato do gel de clorexidina com o interior de implantes resultou em redução significativa na contagem de colônias e provou apresentar efeito antimicrobiano mais prolongado quando comparado com a clorexidina em solução. Os estudos acima mencionados sugerem que a maior efetividade da formulação em gel estaria relacionada à sua capacidade de manter a substância química em contato com os micro-organismos por um tempo mais extenso, quando comparada à formulação líquida. A capacidade que o Photogem[®] gel tem de permanecer aderido às superfícies protéticas durante os procedimentos de pré-irradiação e iluminação pode explicar os melhores resultados obtidos pelos Grupos III e IV. É possível sugerir que o contato constante do biofilme das próteses com o FS gel tenha favorecido a fotossensibilização dos micro-organismos, aumentando a efetividade da PDT.

Para os casos em que a PDT não promoveu esterilização das próteses, foi observada uma redução significativa no número de colônias viáveis. A desinfecção foi observada após os quatro tratamentos utilizando PDT, visto que estes reduziram significativamente mais de 90% dos micro-organismos presentes nas próteses. Embora a corrente investigação tenha sido a primeira a descrever o uso clínico da PDT para desinfecção de próteses, os resultados apresentados podem ser comparáveis com os de pesquisas que aplicaram a PDT para desinfecção clínica em odontologia. Giusti et al.²⁸ avaliaram o uso do Photogem[®] em associação à luz vermelha de LED para descontaminação de dentina bovina cariada. Foi observado que o número inicial de bactérias reduziu mais de 90% após a PDT. Em outro estudo⁶⁶, amostras de placa subgingival de pacientes foram expostas a um laser na presença de azul de toluidina (TBO), promovendo reduções significativas (acima de 90%) na viabilidade de micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos. Dörtbudak et al.²⁴ mostraram que a aplicação de TBO e laser para desinfecção de superfícies de implantes foi capaz de reduzir significativamente (2 log em média) os valores iniciais dos três grupos de bactérias testados.

Além dos estudos acima mencionados, os resultados também estão de acordo com os de outros estudos *in vitro*^{8,51,69,71}. Essas investigações demonstraram a susceptibilidade de bactérias e fungos à PDT, incluindo os micro-organismos encontrados nas próteses em uso pelos pacientes edêntulos. Soares et al.⁶⁹ obtiveram significativa redução no crescimento de células plasmáticas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Candida parapsilosis* após utilização de TBO em associação com luz de LED. Outro estudo⁸ demonstrou a fotossensibilização de *C. albicans* e *C. glabrata* após PDT utilizando Photofrin[®] e Hg arc lamp. De acordo com Tegos et al.⁷¹, o uso de uma clorina conjugada associada com um laser diodo promoveu a inativação de suspensões de *S. aureus*. A susceptibilidade de uma cepa da bactéria *S. mutans* foi verificada após a utilização de um fotopolimerizador em conjunto com o corante Rose Bengal⁵¹. Os resultados dessas pesquisas estão de acordo com os deste estudo, o qual observou que a PDT causou redução significativa de micro-organismos nas próteses.

Outras investigações^{14,67,87} avaliaram o efeito fotodinâmico sobre biofilmes formados *in vitro*, com a finalidade de simular as condições *in vivo*. Dados de pesquisas com biofilmes revelaram que a maioria dos micro-organismos são encontrados na natureza vivendo em comunidades microbianas sobre diferentes superfícies¹⁹. Estudos recentes mostraram que biofilmes de *C. albicans*¹⁴, *S. aureus*⁶⁷ e *S. mutans*⁸⁷ podem ser inativados usando-se diferentes FS e fontes de luz. Neste estudo, as próteses colonizadas com biofilme microbiano, composto de diferentes espécies (observadas no meio não-seletivo), foram esterilizadas após os tratamentos com PDT. Esses resultados confirmam a possibilidade de utilização da PDT para inativação de micro-organismos organizados em comunidades de biofilme. Entretanto, nem todas as próteses foram esterilizadas após a PDT. Uma possível explicação para esses achados poderia estar relacionada às características funcionais e estruturais das células que crescem em biofilmes^{19,67}, as quais poderiam reduzir a sensibilidade dessas células ao dano fotodinâmico. Isso se deve ao fato de as células presentes em biofilmes apresentarem uma matriz extracelular^{19,67}, a qual interage fisicamente com agentes antimicrobianos, contribuindo para a resistência celular a essas drogas¹⁵. Assim, é possível sugerir que a produção da matriz extracelular possa bloquear a difusão do FS através do biofilme⁶⁷, reduzindo a ação da PDT sobre os micro-organismos aderidos às próteses. É importante relatar que o processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção deste, e a presença de oxigênio³³. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com um FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação da amostra sensibilizada. Esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, passando seus elétrons a um estado excitado. Na presença de um substrato, como o oxigênio, o FS retorna ao seu estado natural, transferindo a energia ao substrato, o que promove a formação de espécies reativas, como o oxigênio singlete³². Essa espécie eletrônica de oxigênio é altamente reativa para os constituintes celulares e pode promover a oxidação irreversível dos componentes por meio de lise da

membrana e inativação de proteínas³³. Na PDT, o grau de fotoinativação provavelmente é equivalente à quantidade de oxigênio singlete produzida. A utilização de altas concentrações de FS e de fontes de luz pode aumentar a quantidade de oxigênio reativo produzido e promover maior dano oxidativo sobre as células alvo. Demidova et al.²¹ demonstraram que quantidades elevadas de oxigênio singlete são necessárias para ocasionar a morte de células de *Candida*. Esse fato pode ser atribuído ao maior tamanho das células de *Candida* e à presença de membrana nuclear como uma barreira à penetração do agente FS^{21,89}. Os resultados do nosso estudo confirmam que uma alta quantidade de FS é requerida para inativar *Candida* spp., desde que uma inativação significativa somente foi observada após utilização de 100 mg/L do Photogem[®].

A coleta inicial realizada nas próteses previamente à exposição às micro-ondas e à aplicação da PDT possibilitou determinar a composição microbiana dos biofilmes. Considerando o estudo que utilizou as micro-ondas, foi possível notar que as espécies de *Candida* (76,6%) foram as mais frequentes entre as 30 próteses oriundas dos pacientes, seguidas por *Staphylococcus* spp. (66,6%) e mutans streptococci (53,3%). Já para as 60 próteses avaliadas no estudo que utilizou a PDT, a coleta inicial mostrou maior presença de espécies de *Candida* (60,0%), seguida por mutans streptococci (53,3%) e *Staphylococcus* spp. (48,3%). Esses resultados estão de acordo com os do estudo de Baena-Monroy et al.³, que revelaram a presença dos micro-organismos *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* na parte interna de próteses totais examinadas de pacientes. *C. albicans* foi isolada em 66,7% das próteses, enquanto *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 49,5% dessas próteses. É válido ressaltar ainda que, para as 90 próteses avaliadas neste estudo, as espécies fúngicas isoladas foram *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Vander Abbeele et al.⁷³ confirmaram que a *C. albicans* (77,9%) foi o fungo mais encontrado nas próteses de pacientes, seguida pela *C. glabrata* (44,1%) e *C. tropicalis* (19,1%), respectivamente.

De maneira semelhante aos achados, tanto no estudo com as micro-ondas como no que utilizou a PDT, outras investigações^{29,70} também confirmaram a presença de espécies de *Candida*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* colonizando

as superfícies acrílicas de próteses dentais. Alguns desses estudos relacionaram a colonização das próteses com o desenvolvimento de infecções sistêmicas⁷⁰, como pneumonia, e infecções locais, como estomatite protética³. Essas informações evidenciam a necessidade de estabelecer métodos efetivos para desinfecção de próteses com o intuito de prevenir a contaminação cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese.

Os achados desta investigação sugerem a irradiação por micro-ondas durante 3 minutos (650 W) como um método efetivo para esterilização clínica de próteses. A utilização desse procedimento parece não afetar negativamente propriedades mecânicas dos materiais que compõem as próteses⁵⁸. Além disso, já foi demonstrado que um ciclo de irradiação por micro-ondas durante 3 minutos (650 W) não ocasionava desadaptação da base acrílica¹⁷. Entretanto, para que esse procedimento possa ser indicado como protocolo de esterilização nos ambientes odontológicos, futuros estudos deverão avaliar a integridade das próteses após a utilização de repetidos ciclos de exposição às micro-ondas.

Para os outros grupos avaliados no presente estudo, ocorreu esterilização para algumas próteses, porém os resultados revelaram maior incidência de desinfecção. Embora uma desinfecção considerável das próteses avaliadas tenha ocorrido após 2 minutos de irradiação por micro-ondas, bem como após os quatro tratamentos com PDT, a permanência de micro-organismos sobre as superfícies protéticas pode ser um motivo de preocupação. Preferencialmente, os procedimentos devem ser eficientes para eliminar completamente os micro-organismos, permitindo a esterilização das próteses e certamente a prevenção da infecção cruzada nos ambientes odontológicos.



CONCLUSÃO

5 Conclusão

Com base nas condições experimentais e considerando as limitações do presente estudo, foi possível concluir que:

- a irradiação por micro-ondas durante 3 minutos (650 W) provou ser um método efetivo para esterilização de próteses totais contaminadas com biofilme de pacientes;
- a irradiação por micro-ondas durante 2 minutos provou ser um método efetivo para desinfecção de próteses totais contaminadas com biofilme de pacientes;
- a utilização clínica da PDT, mediada pelo LED em associação com o Photogem[®], foi capaz de promover esterilização de 40%, 47%, 53% e 60% das próteses avaliadas dos grupos I, II, III e IV, respectivamente;
- a utilização clínica da PDT, mediada pelo LED em associação com o Photogem[®], foi capaz de promover desinfecção das próteses totais que não foram esterilizadas;
- para a prevenção de infecção cruzada nos ambientes odontológicos, o método mais adequado para essa finalidade seria o protocolo de irradiação por micro-ondas utilizando 3 minutos e 650 W.



REFERÊNCIAS

6 Referências *

1. Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1992; 68: 191-5.
2. Backenstose WM, Wells JG. Side effects of immersion-type cleansers on the metal components of dentures. *J Prosthet Dent.* 1977; 37: 615-21.
3. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10: E27-9.
4. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dent.* 2001; 21: 4-8.
5. 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.
6. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1989; 135: 957-66.
7. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios.* 1992; 71: 33-46.

* De acordo com estilo Vancouver.

Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
9. Brill N, Tryde G, Stoltze K, El Ghamrawy EA. Ecologic changes in the oral cavity caused by removable partial dentures. *J Prosthet Dent.* 1977; 38: 138-48.
10. Brow SB, Brown EA, Walker I. The present and the future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 497-508.
11. Budtz-Jorgensen E, Theilade E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 288-95.
12. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent.* 1994; 22: 273-8.
13. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DM. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses.* 2007; 50: 140-7.
14. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4288-95.
15. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183: 5385-94.
16. Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1995; 74: 309-13.

17. 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.
18. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-22.
19. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
20. Culkin KA, Fung DYC. Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. *J Milk Food Technol.* 1975; 38: 8-15.
21. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2329-35.
22. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Phys Ther.* 1999; 79: 839-46.
23. Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. *J Prosthet Dent.* 1999; 81: 207-14.
24. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12: 104-8.
25. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, de Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. *J Prosthodont.* 2009 Jun 11. [Epub ahead of print]

26. Fitzpatrick JA, Kwao-Paul J, Massey J. Sterilization of bacteria by means of microwave heating. *J Clin Eng.* 1978; 3: 44-7.
27. Friedrich Jr EG, Phillips LE. Microwave sterilization of *Candida* on underwear fabric. A preliminary report. *J Reprod Med.* 1988; 33: 421-2.
28. Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmerson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, Bagnato VS. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 281-7.
29. Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. *J Am Osteopath Assoc.* 2001; 101: 92-4.
30. Gomes BPF, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants (BES Spring Meeting Abstract). *J Endod.* 1999; 25: 299.
31. Goodson LB, Glass RT, Bullard JW, Conrad RS. A statistical comparison of denture sanitation using a commercially available denture cleaner with and without microwaving. *Gen Dent.* 2003; 51: 148-51.
32. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 436-50.
33. Henderson B, Dougherty TJ. How does the photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992; 55: 145-57.
34. 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.
35. Hiti K, Walochnik J, Faschinger C, Haller-Schober EM, Aspöck H. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea.* 2001; 20: 467-70.

36. Ikawa JY, Rossen JS. Reducing bacteria in household sponges. *J Environ Health*. 1999; 62: 1-5.
37. Jeng DK, Kaczmarek KA, Woodworth AG, Balasky G. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Appl Environ Microbiol*. 1987; 53: 2133-7.
38. Kahn RC, Lancaster M.V, Kate Jr W. The microbiologic cross-contamination of dental prostheses. *J Prosthet Dent*. 1982; 47: 556-9.
39. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Marle JV. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2026-34.
40. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 242: 345-51.
41. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent*. 1999; 81: 202-6.
42. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova*. 2000; 32: 237-43.
43. Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside relin resin. *J Prosthodont*. 2008; 17: 312-7.
44. Monsenego P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study 'in vivo'. *J Oral Rehabil*. 2000; 27: 708-13.
45. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside relin resins. *Int J Prosthodont*. 2003; 16: 616-20.

46. 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.
47. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.* 1998; 26: 299-304.
48. Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent.* 1992; 68: 804-8.
49. Olsen CM. Microwaves inhibit bread mold. *Food Eng.* 1965; 37: 51-3.
50. Paolantonio M, Perinetti G, D'Ercole S, Graziani F, Catamo G, Sammartino G, et al. Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel. *J Periodontol.* 2008; 79: 1419-25.
51. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 353-9.
52. Pavan S, Arioli Filho JN, Dos Santos PH, Mollo Fde A Jr. Effect of microwave treatments on dimensional accuracy of maxillary acrylic resin denture base. *Braz Dent J.* 2005; 16: 119-23.
53. Pavan S, Arioli Filho JN, Dos Santos PH, Nogueira SS, Batista AU. Effect of disinfection treatments on the hardness of soft denture liner materials. *J Prosthodont.* 2007; 16: 101-6.
54. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil.* 2003; 30: 532-6.

55. Pelczar Jr MJ, Chan EC, Krieg NR. Cultivation and growth of microorganisms In: Pelczar Jr MJ, Chan EC, Krieg NR, editors. Microbiology: concepts and applications. New York: McGraw-Hill; 1993. p. 175-98.
56. Powell GL, Runnells RD, Saxon BA, Whisenant BK. The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories. J Prosthet Dent. 1990; 64: 235-7.
57. Ray KC, Fuller ML. Isolation of *Mycobacterium* from dental impression material. J Prosthet Dent. 1963; 13: 93-4.
58. Ribeiro DG, Pavarina AC, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Flexural strength and hardness of relined and denture base acrylic resins after different exposure times of microwave disinfection. Quintessence Int. 2008; 39: 833-40.
59. Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization. J Am Dent Assoc. 1985; 110: 194-8.
60. Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. Microbios. 1994; 78: 55-9.
61. Rudd RW, Senia ES, McCleskey FK, Adams ED Jr. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. J Prosthet Dent. 1984; 51: 318-21.
62. Sagripanti JL, Bonifacino A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. Surg Infect. 2000; 1: 3-14.
63. Sanborn MR, Wan SK, Bulard R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. Appl Environ Microbiol. 1982; 44: 960-4.
64. Sande MA, Gadot F, Wenzel RP. Point source epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in a prosthodontics laboratory. Am Rev Respir Dis. 1975; 112: 213-7.

65. 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.
66. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 1993; 28: 204-10.
67. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 299-305.
68. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2006; 19: 288-93.
69. Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, Pinotti M, et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 94: 65-70.
70. Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. *Gerodontology*. 2003; 20: 84-7.
71. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorine(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 1402-10.
72. Theilade E, Budtz-Jorgensen E, Theilade J. Pre-dominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. *Arch Oral Biol*. 1983; 28: 675-80.
73. Vanden Abbeele A, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008; 25: 222-8.

74. Venezio FR, DiVincenzo C, Sherman R, Reichman M, Origiano TC, Thompson K, et al. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. *J Infect Dis.* 1985; 151: 166-9.
75. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997; 77: 535-9.
76. Verran J, Kossar S, McCord JF. Microbiological study of selected risk areas in dental technology laboratories. *J Dent.* 1996; 24: 77-80.
77. Vianna ME, Gomes BPF, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2004; 97: 79-84.
78. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 13-28.
79. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 406-11.
80. Wakefield CW. Laboratory contamination of dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1980; 44: 143-6.
81. Waltimo T, Tanner J, Vallittu P, Haapasalo M. Adherence of *Candida albicans* to the surface of polymethylmethacrylate—E glass fiber composite used in dentures. *Int J Prosthodont.* 1999; 12: 83-6.
82. 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.
83. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005; 22: 168-76.
84. Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 416-23.

85. Williams HN, Falkler WA Jr, Hasler JF, Libonati JP. The recovery and significance of nonoral opportunistic pathogenic bacteria in dental laboratory pumice. *J Prosthet Dent.* 1985; 54: 725-30.
86. Wilson M, Mia N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22: 354-7.
87. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 324-30.
88. Zarb GA, Mackay HF. The partially edentulous patient. I. The biologic price of prosthodontic intervention. *Aust Dent J.* 1980; 25: 63-8.
89. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144:274-8.



APÊNDICE

7 Apêndice

7.1 Apêndice 1 - Micro-ondas

Forma de análise dos resultados

Neste estudo foi verificada a variável contagem de colônias em ufc/mL antes e após a irradiação por micro-ondas (grupos controle e experimental, respectivamente). Para a variável foram estabelecidos dois fatores de variação: meio de cultura, em 4 níveis e tempo de irradiação, em 2 níveis. O total de amostras obtidas para cada tempo de exposição às micro-ondas foi de 15 próteses totais oriundas de pacientes.

Para determinar a efetividade das micro-ondas na desinfecção das próteses avaliadas, foi necessário calcular o número de micro-organismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido antes e após a aplicação das micro-ondas. Foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido, para cada micro-organismo, o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Após a obtenção desse valor nos meios de cultura, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas sementeiras das placas. No presente estudo, q= 0,025 já que foram pipetados 25 µL para cada diluição.

Os valores de ufc/mL foram extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos, os valores de ufc/mL foram transformados para logaritmo na base dez. A transformação logarítmica facilitou a interpretação dos resultados, mas não

garantiu a validade da aplicação de procedimentos estatísticos paramétricos. Então, métodos estatísticos não-paramétricos de análise de dados foram utilizados, apenas para o tempo de 2 minutos de irradiação por micro-ondas.

Com a finalidade de comparar se o antes e o após a exposição às micro-ondas apresentaram resultados iguais ou diferentes, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com a hipótese nula de que estes seriam iguais. O método avaliou os postos médios das contagens de micro-organismos antes e após a irradiação por micro-ondas, que são os mesmos para os dados originais e para os dados transformados em logaritmo. Seguiram-se ao teste de Kruskal-Wallis, comparações múltiplas não-paramétricas dos postos médios pelo teste de Dunn. Adotou-se o nível de 5% de significância como regra de decisão para aceitar como significativa uma diferença entre postos médios.

Resultados

Os valores originais em ufc/mL relacionados às coletas de material microbiológico das próteses antes e após a irradiação por micro-ondas durante 3 minutos (Grupo 1) e 2 minutos (Grupo 2) estão descritos nas Tabelas A1 e A2, respectivamente.

Para o tempo de 3 minutos de irradiação por micro-ondas foi observado que após todas as próteses serem submetidas às micro-ondas, não houve crescimento microbiano nos meios de culturas seletivos bem como no meio não-seletivo. Sendo assim, pelos resultados apresentarem-se todos zero (Tabela A1), não foi possível realizar qualquer método estatístico, pois o método de desinfecção proposto mostrou-se efetivo na esterilização das próteses, após 48 horas de incubação.

Para o tempo de 2 minutos de irradiação, de acordo com a A2, foi possível observar que os valores originais de ufc/mL das amostras apresentam-se elevados e com uma variabilidade acentuada. A transformação logarítmica diminuiu a assimetria, mas não conseguiu a homogeneização da variabilidade. Como não houve homogeneização da variabilidade, optou-se pela análise não-

paramétrica dos resultados. O método estatístico adotado foi o de Kruskal-Wallis, que avaliou os postos médios de valores de ufc/mL, após a transformação para logaritmo na base de 10. O teste não-paramétrico apresentou para os meios seletivos de *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., mutans streptococci e para os micro-organismos cultivados em meio não-seletivo, os seguintes valores de H: 7,49; 5,61; 8,00 e 21,79, respectivamente. Cada um destes valores correspondeu aos seguintes valores de probabilidade: $P = 0,0062$ (*Candida* spp.); $P = 0,0178$ (*Staphylococcus* spp.); $P = 0,0047$ (mutans streptococci) e $P < 0,0001$ (para os micro-organismos cultivados em meio não-seletivo). Em seguida, foram realizadas comparações dos postos médios (antes= A e após= B) pelo teste de Dunn (Tabela A3).

Tabela A1 - Contagens de ufc/mL dos micro-organismos presentes em cada meio de cultura, oriundos de cada prótese, antes e após a irradiação por micro-ondas (MI) durante 3 minutos (Grupo 1). Estatística descritiva das contagens

Próteses	Grupo 1							
	<i>Candida</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		mutans streptococci		Espécies não identificadas	
	Antes MI	Após MI	Antes MI	Após MI	Antes MI	Após MI	Antes MI	Após MI
Totais								
1	2,80E+03	0	0	0	1,40E+04	0	1,20E+07	0
2	4,40E+02	0	4,00E+01	0	6,00E+05	0	8,40E+03	0
3	5,28E+03	0	1,20E+03	0	2,20E+03	0	1,20E+07	0
4	1,20E+03	0	8,00E+01	0	0	0	3,16E+03	0
5	8,00E+01	0	6,00E+02	0	9,20E+02	0	1,02E+05	0
6	0	0	0	0	0	0	3,60E+04	0
7	3,28E+04	0	3,96E+04	0	3,60E+06	0	4,12E+06	0
8	2,80E+02	0	0	0	0	0	1,20E+06	0
9	2,80E+04	0	1,00E+03	0	1,20E+05	0	3,28E+05	0
10	0	0	4,00E+01	0	0	0	2,28E+05	0
11	6,80E+02	0	0	0	1,60E+02	0	1,88E+04	0
12	3,40E+03	0	4,00E+01	0	0	0	4,72E+06	0
13	0	0	0	0	0	0	7,16E+04	0
14	5,48E+03	0	2,56E+03	0	0	0	2,36E+04	0
15	9,68E+04	0	8,00E+02	0	6,00E+02	0	1,20E+07	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0	3,16E+03	0
Máximo	9,68E+04	0	3,96E+04	0	3,60E+06	0	1,20E+07	0
Mediana	1,20E+03	0	4,00E+01	0	1,60E+02	0	2,28E+05	0
Média	1,18E+04	0	3,06E+03	0	2,89E+05	0	3,12E+06	0

Tabela A2 - Contagens de ufc/mL dos micro-organismos presentes em cada meio de cultura, oriundos de cada prótese, antes e após a irradiação por micro-ondas (MI) durante 2 minutos (Grupo 2). Estatística descritiva das contagens

Grupo 2								
Próteses	<i>Candida</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		mutans streptococci		Espécies não identificadas	
	Antes MI	Após MI	Antes MI	Após MI	Antes MI	Após MI	Antes MI	Após MI
16	2,60E+04	0	2,04E+04	8,00E+01	4,08E+06	2,00E+02	6,64E+06	1,60E+02
17	0	0	0	0	0	0	2,88E+06	1,60E+02
18	6,16E+03	2,80E+02	2,84E+03	4,00E+01	2,64E+05	0	6,00E+04	8,00E+01
19	0	0	8,00E+01	0	1,20E+02	0	2,76E+05	2,08E+03
20	4,76E+03	1,20E+02	1,20E+02	0	5,20E+04	0	1,36E+05	4,00E+01
21	2,96E+03	4,00E+01	1,20E+02	0	0	0	1,00E+07	0
22	2,40E+02	0	8,00E+01	0	0	0	7,60E+05	7,60E+02
23	3,88E+05	2,00E+02	8,00E+03	0	2,28E+05	0	1,20E+07	0
24	7,60E+02	0	0	0	4,48E+03	1,20E+02	8,00E+03	1,20E+02
25	8,00E+01	0	8,00E+01	8,00E+01	0	0	3,80E+03	0
26	0	0	0	0	0	0	1,60E+05	2,76E+03
27	0	0	0	0	0	0	1,20E+07	2,60E+03
28	1,36E+04	0	0	0	3,68E+05	0	7,16E+05	0
29	2,88E+03	8,00E+01	2,08E+03	0	0	0	8,00E+05	0
30	1,92E+04	4,00E+01	3,92E+03	2,00E+02	6,08E+06	2,00E+02	1,20E+07	2,80E+03
Mínimo	0	0	0	0	0	0	3,80E+03	0
Máximo	3,88E+05	2,80E+02	2,04E+04	2,00E+02	6,08E+06	2,00E+02	1,20E+07	2,80E+03
Mediana	2,88E+03	0	8,00E+01	0	1,20E+02	0	7,60E+05	1,20E+02
Média	3,10E+04	5,07E+01	2,51E+03	2,67E+01	7,38E+05	3,47E+01	3,90E+06	7,71E+02

Tabela A3 - Resultados da análise de comparações múltiplas dos postos médios pelo método de Dunn

Comparações	Dif. postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios A e B (<i>Candida</i> spp.)	8,8	2,74	1,96	< 0,05
Postos médios A e B (<i>Staphylococcus</i> spp.)	7,6	2,36	1,96	< 0,05
Postos médios A e B (mutans streptococci)	7,11	2,83	1,96	< 0,05
Postos médios A e B (meio não seletivo)	15	4,67	1,96	< 0,05

Os resultados da prevalência das diferentes espécies identificadas nas 30 próteses totais antes das mesmas serem submetidas às micro-ondas estão contidos na Tabela 1 do Capítulo 1. Além disso, as espécies identificadas em cada prótese podem ser observadas na Tabela 2 do Capítulo 1.

7.2 Apêndice 2 - Terapia fotodinâmica

Forma de análise dos resultados

Nesta parte do estudo foi utilizada a mesma variável como também os mesmos fatores de variação e igual cálculo do número de micro-organismos viáveis, em valores de ufc/mL, descritos no Apêndice 1.

Para verificar a efetividade da PDT em promover ou não a inativação de micro-organismos presentes nas próteses totais, foi aplicado um teste pareado, pois cada observação antes da aplicação do tratamento era pareada com outra após o tratamento. Neste caso, o teste utilizado foi o de McNemar, pois o mesmo é bastante indicado para comparações do antes e após a aplicação de determinado tratamento. A hipótese científica testada foi se a PDT ocasionou algum efeito sobre os micro-organismos encontrados nas próteses. A hipótese estatística foi dada por:

$$H_0: p_1 = p_2$$

$$H_1: p_1 \neq p_2$$

onde: p_1 representa a probabilidade de sucesso antes da aplicação do tratamento e p_2 representa a probabilidade de sucesso após a aplicação do tratamento. Se a hipótese nula fosse aceita, significaria que o tratamento não promoveu efeito na esterilização das próteses. Caso a hipótese nula não fosse aceita, então, o tratamento em questão esteriliza de alguma maneira as próteses.

Para realizar o teste foi necessário classificar cada grupo de pacientes, ou seja, cada grupo de próteses utilizadas, conforme o modelo da tabela abaixo:

Tabela A4 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar.

Número de próteses		Após o tratamento		Total
Frequência (%)		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	a	b	a+b
	Não zerado	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	n

A estatística teste foi dada por:

$$T = (b-c)^2 / b+c$$

A maneira mais adequada para analisar o resultado do teste foi observando o valor de p, representado nas tabelas das análises de McNemar por Pr. Quando o valor de p foi menor que 0,05, a hipótese nula foi rejeitada, indicando que o tratamento testado produziu algum efeito de esterilização. Quando a hipótese nula foi aceita, o tratamento em questão não mostrou efetividade. Para o presente estudo, o valor de p indicou um teste com 95% de confiança. A análise foi realizada no software SAS que já realiza o cálculo da porcentagem para cada situação descrita na Tabela A4. O teste de McNemar não pôde ser aplicado para os meios não-seletivos, já que, nesses casos, não havia valores zerados antes do tratamento. As conclusões sobre os achados para os meios não-seletivos foram obtidas pela observação do número de próteses esterilizadas após os tratamentos.

Como o teste de McNemar aponta somente se a quantidade de próteses esterilizadas foi significativa ou não, para os casos em que ainda houve crescimento de micro-organismos após a aplicação dos tratamentos, foi calculada a porcentagem de redução no número de micro-organismos. As reduções acima de 90% foram consideradas como significativas.

Com a finalidade de comparar se os tratamentos apresentaram resultados iguais ou diferentes, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com a hipótese nula de que todos os tratamentos seriam iguais.

Resultados

Os valores originais em ufc/mL relacionados às coletas de material microbiológico das próteses antes e após os tratamentos da PDT (Grupos I e II- utilização de Photogem[®] em suspensão nas concentrações de 50 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente; Grupos III e IV- utilização de Photogem[®] em gel nas concentrações de 50 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente.) estão descritos nas Tabelas A5 a A8, respectivamente.

Tabela A5 - Contagens de ufc/mL dos micro-organismos presentes em cada meio de cultura, oriundos de cada prótese, antes e após os tratamentos de PDT para o Grupo I. Estatística descritiva das contagens

Próteses	Grupo I							
	<i>Candida spp.</i>		<i>Staphylococcus spp.</i>		mutans streptococci		Espécies não identificadas	
	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT
Totais								
1	0	0	4,00E+01	0	0	0	5,64E+04	0
2	2,64E+03	8,00E+01	4,00E+02	4,00E+01	1,56E+04	2,00E+02	6,40E+05	8,00E+01
3	0	0	0	0	0	0	3,20E+05	8,00E+01
4	1,60E+02	8,00E+01	0	0	0	0	1,20E+05	8,00E+01
5	0	0	2,40E+02	0	2,72E+04	2,80E+02	1,16E+05	8,00E+01
6	2,24E+04	0	0	0	1,60E+03	0	1,20E+06	0
7	2,56E+03	0	0	0	0	0	1,20E+06	0
8	1,96E+03	2,00E+02	0	0	1,56E+03	1,60E+02	8,40E+04	2,00E+03
9	6,08E+03	1,20E+02	1,36E+04	1,20E+02	2,08E+04	3,60E+02	7,44E+05	2,52E+03
10	0	0	2,00E+02	0	1,80E+04	2,80E+02	1,20E+05	1,20E+04
11	0	0	0	0	0	0	3,68E+04	0
12	1,44E+03	0	2,40E+02	0	8,00E+02	0	5,16E+04	0
13	6,04E+03	4,00E+01	8,80E+02	4,00E+01	4,24E+04	4,00E+02	1,20E+05	4,00E+02
14	0	0	0	0	0	0	8,04E+04	0
15	4,08E+03	8,00E+01	0	0	0	0	3,08E+05	1,20E+02
Mínimo	0	0	0	0	0	0	3,68E+04	0
Máximo	2,24E+04	2,00E+02	1,36E+04	1,20E+02	4,24E+04	4,00E+02	1,20E+06	1,20E+04
Mediana	1,44E+03	0	0	0	8,00E+02	0	1,20E+05	8,00E+01
Média	3,16E+03	4,00E+01	1,04E+03	1,33E+01	8,53E+03	1,12E+02	3,46E+05	1,16E+03

Tabela A6 - Contagens de ufc/mL dos micro-organismos presentes em cada meio de cultura, oriundos de cada prótese, antes e após os tratamentos de PDT para o Grupo II. Estatística descritiva das contagens

Próteses	Grupo II							
	<i>Candida</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		mutans streptococci		Espécies não identificadas	
	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT
Totais								
16	1,24E+04	0	0	0	1,72E+04	0	1,80E+04	0
17	5,00E+03	0	0	0	1,72E+05	0	4,00E+05	0
18	6,08E+04	4,00E+01	0	0	1,32E+06	0	1,20E+07	4,80E+02
19	0	0	0	0	2,20E+04	0	1,20E+04	0
20	0	0	4,00E+02	0	0	0	1,20E+03	0
21	1,96E+04	2,00E+02	0	0	2,00E+05	0	5,24E+04	1,00E+03
22	0	0	1,28E+03	8,00E+01	0	0	2,52E+04	4,00E+02
23	9,60E+02	1,20E+02	1,64E+03	1,60E+02	1,20E+04	2,00E+02	3,80E+05	1,60E+03
24	0	0	0	0	1,60E+06	2,80E+02	5,00E+06	4,40E+02
25	0	0	0	0	0	0	2,80E+03	0
26	1,56E+03	8,00E+01	8,40E+02	8,00E+01	0	0	4,40E+05	8,80E+02
27	2,52E+04	8,00E+01	4,00E+01	0	2,24E+06	4,00E+02	3,04E+05	1,40E+03
28	4,00E+01	0	0	0	0	0	1,20E+07	1,72E+03
29	0	0	4,00E+01	0	2,96E+05	0	3,60E+06	0
30	4,00E+01	0	4,00E+01	0	0	0	5,84E+06	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0	1,20E+03	0,00E+00
Máximo	6,08E+04	2,00E+02	1,64E+03	1,60E+02	2,24E+06	4,00E+02	1,20E+07	1,72E+03
Mediana	4,00E+01	0	0	0	1,72E+04	0	3,80E+05	4,00E+02
Média	8,37E+03	3,47E+01	2,85E+02	2,13E+01	3,92E+05	5,87E+01	2,67E+06	5,28E+02

Tabela A7 - Contagens de ufc/mL dos micro-organismos presentes em cada meio de cultura, oriundos de cada prótese, antes e após os tratamentos de PDT para o Grupo III. Estatística descritiva das contagens

Próteses	Grupo III							
	<i>Candida</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		mutans streptococci		Espécies não identificadas	
	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT
31	1,20E+04	0	0	0	2,20E+04	0	4,00E+06	0
32	0	0	0	0	0	0	3,60E+03	0
33	1,28E+05	0	4,00E+02	0	0	0	8,00E+05	0
34	1,60E+04	0	2,00E+02	0	8,80E+02	0	7,60E+05	0
35	0	0	0	0	2,44E+05	0	2,28E+05	0
36	2,64E+04	4,00E+02	9,60E+02	0	5,92E+05	1,84E+03	1,20E+06	2,00E+03
37	5,80E+03	2,00E+02	0	0	0	0	1,72E+05	4,80E+02
38	0	0	0	0	1,40E+03	0	6,96E+04	0
39	4,04E+03	1,20E+02	1,64E+04	3,60E+02	3,08E+04	1,04E+03	4,76E+05	1,68E+03
40	0	0	0	0	0	0	2,08E+03	0
41	0	0	0	0	0	0	2,64E+04	0
42	2,84E+03	2,40E+02	2,00E+02	0	4,68E+04	0	4,28E+04	6,00E+02
43	0	0	3,80E+04	4,00E+02	0	0	1,20E+05	2,36E+03
44	3,52E+04	5,60E+02	0	0	8,08E+04	2,36E+03	7,36E+03	3,20E+02
45	4,88E+03	2,80E+02	3,04E+03	1,20E+02	0	0	2,72E+05	1,04E+03
Mínimo	0	0	0	0	0	0	2,08E+03	0
Máximo	1,28E+05	5,60E+02	3,80E+04	4,00E+02	5,92E+05	2,36E+03	4,00E+06	2,36E+03
Mediana	4,04E+03	0	0	0	8,80E+02	0	1,72E+05	0
Média	1,57E+04	1,20E+02	3,95E+03	5,87E+01	6,79E+04	3,49E+02	5,45E+05	5,65E+02

Tabela A8 - Contagens de ufc/mL dos micro-organismos presentes em cada meio de cultura, oriundos de cada prótese, antes e após os tratamentos de PDT para o Grupo IV. Estatística descritiva das contagens

Grupo IV								
Próteses	<i>Candida</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		mutans streptococci		Espécies não identificadas	
	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT	Antes PDT	Após PDT
46	8,00E+02	0	1,40E+03	2,00E+02	0	0	3,72E+04	1,52E+03
47	6,00E+03	8,00E+02	9,20E+02	0	2,68E+03	1,60E+02	2,20E+05	8,00E+02
48	0	0	3,60E+02	0	0	0	1,28E+05	0
49	8,36E+03	1,36E+03	2,84E+03	4,00E+02	0	0	6,40E+05	1,20E+04
50	0	0	0	0	7,60E+02	0	4,44E+05	0
51	1,76E+03	0	4,00E+01	0	0	0	2,80E+05	0
52	0	0	0	0	8,40E+02	0	3,80E+05	0
53	4,80E+02	0	0	0	1,88E+04	0	2,20E+05	0
54	0	0	0	0	0	0	1,84E+05	0
55	4,28E+03	8,80E+02	2,00E+02	0	0	0	2,92E+06	2,00E+03
56	7,52E+03	9,60E+02	0	0	1,60E+06	1,00E+03	2,68E+05	6,80E+02
57	0	0	4,00E+01	0	1,32E+05	0	5,60E+05	0
58	1,28E+04	3,20E+02	1,08E+03	0	4,76E+03	6,00E+02	1,40E+05	1,04E+03
59	0	0	0	0	0	0	1,96E+05	0
60	2,44E+03	0	0	0	0	0	2,72E+06	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0	3,72E+04	0
Máximo	1,28E+04	1,36E+03	2,84E+03	4,00E+02	1,60E+06	1,00E+03	2,92E+06	1,20E+04
Mediana	8,00E+02	0	40	0	0	0	2,68E+05	0
Média	2,96E+03	2,88E+02	4,59E+02	4,00E+01	1,17E+05	1,17E+02	6,22E+05	1,20E+03

▪ Photogem® suspensão 50 mg/L

A. *Candida spp.*

Tabela A9 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Candida spp.*

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	6 40.0	0 0.0	6 40.0
	Não zerado	3 20.0	6 40.0	9 60.0
Total		9 60.0	6 40.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	3.0000
DF	1
Pr > S	0.0833

B. *Staphylococcus spp.*

Tabela A10 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Staphylococcus spp.*

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	8 53.3	0 0.0	8 53.3
	Não zerado	4 26.6	3 20.0	7 46.6
Total		12 80.0	3 20.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	40000
DF	1
Pr > S	0.0455

C. mutans streptococci

Tabela A11 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para mutans streptococci

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	7 46.67	0 0.00	7 46.67
	Não zerado	2 13.33	6 40.00	8 53.33
Total		9 60.00	6 40.00	15 100.00

McNemar's Test	
Statistic (S)	2.0000
DF	1
Pr > S	0.1573

D. Meio não-seletivo

Tabela A12 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para o meio não-seletivo

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Não zerado	6 40.0	9 60.0	15 100.0
Total		6 40.0	9 60.0	15 100.0

▪ **Photogem[®] suspensão 100 mg/L**

A. *Candida* spp.

Tabela A13 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Candida* spp.

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	6 40.0	0 0.0	6 40.0
	Não zerado	4 26.6	5 33.3	9 60.0
Total		10 66.6	5 33.3	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	4.0000
DF	1
Pr > S	0.0455

B. *Staphylococcus* spp.

Tabela A14 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Staphylococcus* spp.

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	8 53.3	0 0.0	8 53.3
	Não zerado	4 26.6	3 20.0	7 46.6
Total		12 80.0	3 20.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	4.0000
DF	1
Pr > S	0.0455

C. mutans streptococci.

Tabela A15 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para mutans streptococci

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	6 40.0	0 0.0	6 40.0
	Não zerado	6 40.0	3 20.0	9 60.0
Total		12 80.0	3 20.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	6.0000
DF	1
Pr > S	0.0143

D. Meio não-seletivo

Tabela A16 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para o meio não-seletivo

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Não zerado	7 46.6	8 53.3	15 100.0
	Total	7 46.6	8 53.3	15 100.0

▪ Photogem[®] gel 50 mg/L

A. *Candida* spp.

Tabela A17 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Candida* spp.

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	6 40.0	0 0.0	6 40.0
	Não zerado	3 20.0	6 40.0	9 60.0
Total		9 60.0	6 40.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	3.0000
DF	1
Pr > S	0.0833

B. *Staphylococcus* spp.

Tabela A18 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Staphylococcus* spp.

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	8 53.3	0 0.0	8 53.3
	Não zerado	4 26.6	3 20.0	7 46.6
Total		12 80.0	3 20.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	4.0000
DF	1
Pr > S	0.0455

C. mutans streptococcus

Tabela A19 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para mutans streptococci

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	7 46.6	0 0.0	7 46.6
	Não zerado	5 33.3	3 20.0	8 53.3
Total		12 80.0	3 20.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	5.0000
DF	1
Pr > S	0.0253

D. Meio não-seletivo

Tabela A20 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para o meio não-seletivo

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Não zerado	8 53.3	7 46.6	15 100.0
	Total	8 53.3	7 46.6	15 100.0

▪ Photogem[®] gel 100 mg/L

A. *Candida* spp.

Tabela A21 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Candida* spp.

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	6 40.0	0 0.0	6 40.0
	Não zerado	4 26.6	5 33.3	9 60.0
Total		10 66.6	5 33.3	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	4.0000
DF	1
Pr > S	0.0455

B. *Staphylococcus* spp.

Tabela A22 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para *Staphylococcus* spp.

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	7 46.6	0 0.0	7 46.6
	Não zerado	6 40.0	2 13.3	8 53.3
Total		13 86.6	2 13.3	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	6.0000
DF	1
Pr > S	0.0143

C. mutans streptococci

Tabela A23 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para aplicação do teste de McNemar, para mutans streptococci

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Zerado	8 53.3	0 0.0	8 53.3
	Não zerado	4 26.6	3 20.0	7 46.6
Total		12 80.0	3 20.0	15 100.0

McNemar's Test	
Statistic (S)	4.0000
DF	1
Pr > S	0.0455

D. Meio não-seletivo

Tabela A24 - Classificação do número e frequência (%) de próteses para o meio não-seletivo

Número de próteses Frequência (%)		Após o tratamento		Total
		Zerou	Não zerou	
Antes do tratamento	Não zerado	9 60.0	6 40.0	15 100.0
	Total	9 60.0	6 40.0	15 100.0

Os resultados de redução no número de micro-organismos obtidos em cada grupo experimental de acordo com o meio de cultura avaliado estão apresentados na Tabela 1 do Capítulo 2.

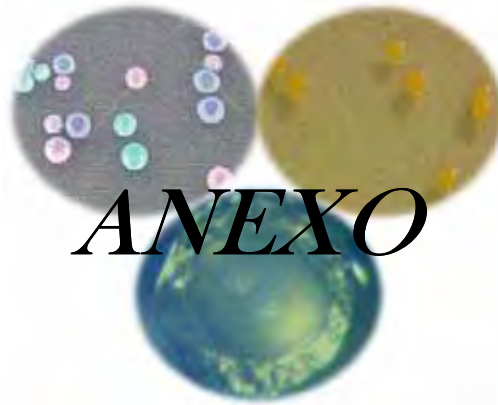
Para verificar se todos os tratamentos com PDT apresentaram resultados estatisticamente iguais para cada meio de cultura, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e os valores de p obtidos estão descritos na Tabela A25.

Tabela A25 - Comparação entre os grupos de PDT, para cada meio avaliado, pela observação do valor de p obtido após o teste de Kruskal-Wallis

	Valores p de Kruskal-Wallis para cada meio de cultura			
	CHROMagar [*]	Manitol Salt Agar [§]	SB20 [†]	Mueller Hinton [‡]
Grupos de PDT	0,77	0,82	0,76	0,95

*CHROMagar foi utilizado para observar o crescimento de *Candida* spp.; §Manitol Salt Agar foi utilizado para observar o crescimento de *Staphylococcus* spp.; †SB20 foi utilizado para observar o crescimento de mutans streptococci; ‡Mueller Hinton foi utilizado para observar o crescimento de qualquer micro-organismo.

Os resultados da prevalência das diferentes espécies identificadas nas 60 próteses totais antes das mesmas serem submetidas à PDT estão demonstrados na Tabela 2 do Capítulo 2. Além disso, as espécies identificadas em cada prótese podem ser observadas na Figura 2 do Capítulo 2.



ANEXO

8 Anexo

8.1 Anexo 1 - Quadros e Tabela

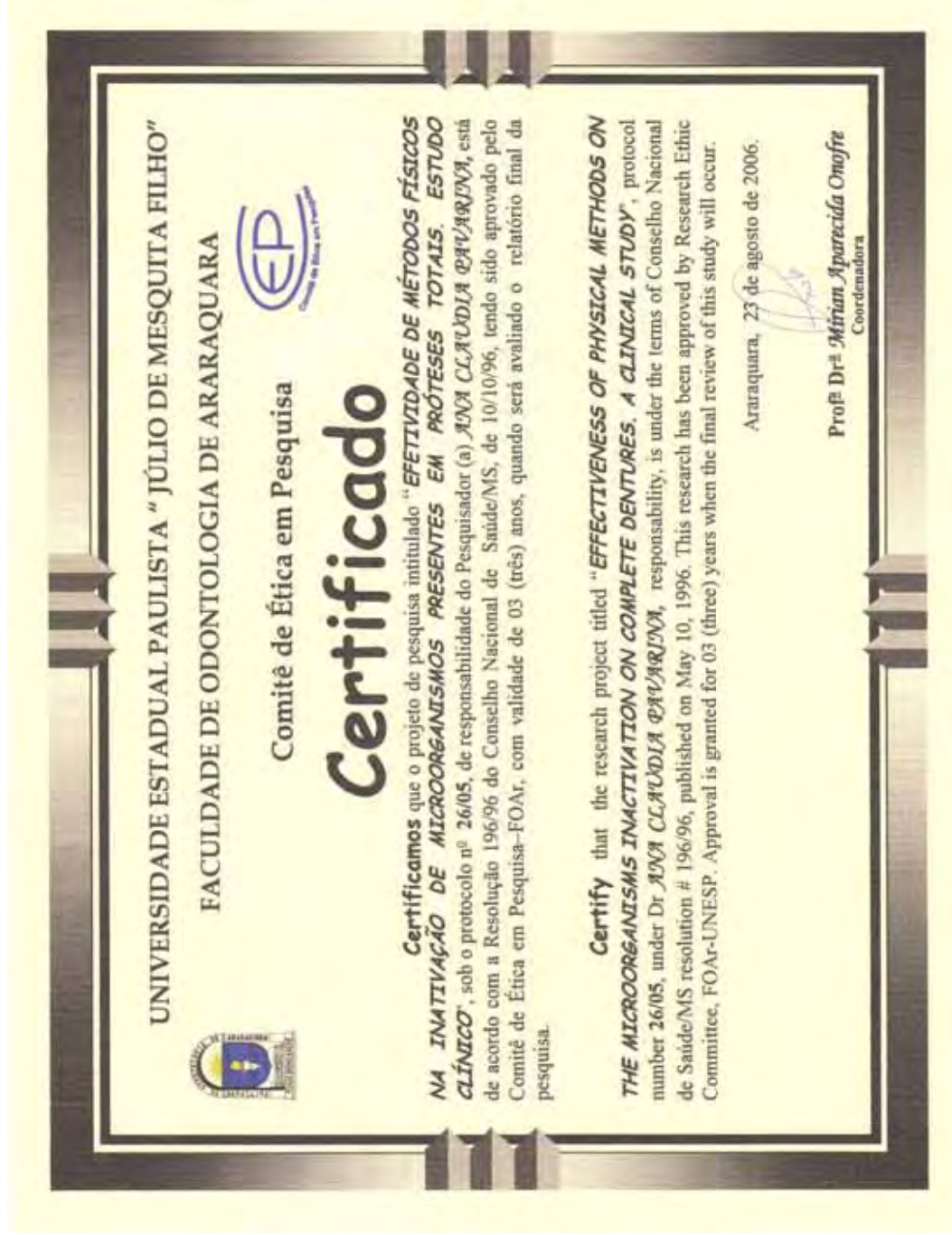
Quadro 1 - Critérios de identificação bioquímica das espécies de *Streptococcus* grupo *mutans*

Provas	<i>S. mutans</i>	<i>S. rattus</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. ferus</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. downei</i>
Biotipos	I	II	III	IV			
Sorotipos	c, f	e	a	d, g	c	c	h
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Melibiose	+	-	+	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	-	-	+	-
Produção de H ₂ O ₂	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólise de arginina	-	+	-	-	-	-	-
Resistência à bacitracina	+	+	-	+	-	-	-

Quadro 2 - Identificação das espécies de *Candida* pelo meio de cultura cromogênico CHROMagar® *Candida* (Probac do Brasil)

ESPÉCIE	COLORAÇÃO DA COLÔNIA
<i>Candida albicans</i>	Verde
<i>Candida glabrata</i>	Roxa
<i>Candida tropicalis</i>	Azul
Outras espécies	Branco a Violeta

8.2 Anexo 2 - Certificado do Comitê de Ética



8.3 Anexo 3 - Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os fins éticos e legais, que eu, (nome) _____, (nacionalidade) _____, portador do RG n. _____, C.P.F.n. _____ residente à _____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo voluntariamente em participar da pesquisa **“EFETIVIDADE DE MÉTODOS FÍSICOS NA INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM PRÓTESES TOTAIS. ESTUDO CLÍNICO.”**, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina e de sua orientada a CD Daniela Garcia Ribeiro, que executará a pesquisa. Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1 - Fui devidamente esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo avaliar os efeitos de dois métodos de desinfecção de próteses, por meio de irradiação por microondas e da terapia fotodinâmica com LED. Caso seja comprovada a eficiência dos métodos, serei beneficiado com a pesquisa, pois os métodos poderão ser indicados para controle de infecção, principalmente entre consultório odontológico e laboratório de prótese, utilizando métodos simples e de custo acessível. Não receberei nenhuma forma de tratamento odontológico como parte do estudo, ao menos que, minha prótese seja danificada por qualquer procedimento decorrente do tratamento proposto.

2 - Fui esclarecido que a realização da pesquisa não implica em riscos aos participantes, uma vez que os procedimentos clínicos que serão realizados já fazem parte de exames complementares que podem ser realizados em clínica odontológica. Fui também conscientizado de que os tratamentos serão realizados apenas em minha prótese superior, não havendo atuação direta à minha pessoa. Estou ciente que durante qualquer procedimento da pesquisa serão seguidos todos os princípios de biossegurança durante os exames, ou seja, o operador estará protegido por meio

Protocolo CEP nº 2016/015
 - Aprovado em 12/07/16
 Secretária do CEP-FO/CAE

da utilização de luvas descartáveis, máscara, gorro e óculos, e todo o instrumental clínico será esterilizado.

3 – Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas à metodologia e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.

4 – Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; dos dados obtidos com a pesquisa. Recebi a garantia do sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

5 – Caso haja qualquer intercorrência odontológica durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar o pesquisador responsável, a Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, ou sua orientada a CD Daniela Garcia Ribeiro pelo telefone (16) 3301-6410.

6 – Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade de consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação adicional em relação a pesquisa da qual participo, pelos telefones (16) 3301-6432 ou (16) 3301-6434.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, lido e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, de de 200...

Assinatura do paciente

Profª. Dra. Ana Cláudia Pavarina
Pesquisador responsável

Daniela Garcia Ribeiro
Orientada

Protocolo CEP Nº 26 / 05
Aprovação em 19 / 08 / 06
Secretaria de CEP-FO/CAAn

8.4 Anexo 4 - Formulário

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Data:

Nome:

Idade:

Data de nascimento:

Naturalidade:

Nacionalidade:

Estado civil:

Sexo:

Raça:

Profissão:

Local de trabalho/fone:

Endereço completo:

Cidade:

Estado:

Fone:

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE GERAL

Está tomando algum medicamento? () sim () não

- 1) () Hipoglicemantes 2) () Anticoncepcionais 3) () Antihipertensivo
 4) () Insulina 5) () Antialérgicos 6) () Antibióticos 7) () Anticoagulantes
 8) () Corticóides 9) () Psiquiátricos 10) () Analgésicos
 11) () Anticonvulsivantes 12) () Outros 13) () Não soube relatar

Quais?

Apresenta ou apresentou algum problema de saúde relacionado aos seguintes sistemas:

- 1) Cardiovascular () sim () não 2) Endócrino () sim () não
 2) 2.1) Diabetes () sim () não Tipo I () Tipo II ()
 3) Genito-urinário () sim () não 4) Hematológico () sim () não
 5) Neurológico () sim () não 6) Psiquiátrico () sim () não
 7) Imunológico () sim () não 8) Respiratório () sim () não

- 9) Gastro-intestinal () sim () não 10) Músculo/esquelético () sim () não
 11) Pele () sim () não 12) Doenças infecto-contagiosas () sim () não
 13) Outros () sim () não 14) Não apresenta problemas () sim () não
 15) História familiar () sim () não

Quais?

Vícios:

1) Tabaco Há quanto tempo?_____ Fuma ()

Qto/dia/semana?_____

() sim () não Tipo_____ Masca ()

2) Álcool Há quanto tempo?_____

Qto/dia/semana?_____

() sim () não Tipo_____

3) Ex-tabagista? Há quanto deixou?_____

Qto/dia/semana?_____

() sim () não Tipo_____ Por qto
tempo?_____

4) Ex-alcoolista? Há quanto deixou?_____

Qto/dia/semana?_____

() sim () não Tipo_____ Por qto
tempo?_____

5) Outras drogas? Qto/dia/semana?_____

() sim () não Tipo_____

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE BUCAL

Sente a boca seca? () sim () não

Faz uso de soluções para bochechos? () sim () não

Especificar: _____

Usa prótese removível? Superior () sim () não

Tipo: _____

Inferior () sim () não

Tipo: _____

Há quanto tempo usa prótese? Superior: _____

Inferior: _____

Há quanto tempo é desdentado? _____

Há quanto tempo usa a (s) prótese (s) atual (is)?

Superior: _____

Inferior: _____

Frequência de uso: Contínuo () Esporádico () Retira pra dormir? ()
sim () não

Condições da (s) prótese (s) atual (is)? Adequada () Inadequada ()

Higieniza sua prótese? () sim () não O que utiliza para
isso?: _____

Já imergiu ou imerge sua prótese em alguma solução desinfetante? () sim ()
não Qual? _____

OBS:

Autorização para reprodução

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Araraquara, 17 de julho de 2009.

DANIELA GARCIA RIBEIRO