



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Ewerton Garcia de Oliveira Mima

*Efeito do tempo de irradiação
sobre a efetividade da
desinfecção em microondas de
uma resina para
reembasamento*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina
Co-Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena P. Spolidório

Araraquara
2005

Mima, Ewerton Garcia de Oliveira

Efeito do tempo de irradiação sobre a efetividade da desinfecção em microondas de uma resina para reembasamento / Ewerton Garcia de Oliveira Mima – Araraquara : [s.n.], 2005. 150 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Reembasadores de dentadura 2. Esterilização 3. Microondas 4. Infecção – Transmissão I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646

Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina – Orientadora

Professor Assistente Doutor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Machado

Professor Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Prof^a. Dr^a. Alma Blásida Concepción Elizaur Benitez

Catirse

Professor Doutor do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Dados Curriculares

Ewerton Garcia de Oliveira Mima

NASCIMENTO 14 de junho de 1980 – Toledo, Paraná

FILIAÇÃO Pedro Iwao Mima

Olívia Garcia de Oliveira Mima

1999 a 2002 curso de graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2003 a 2005 curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

A **Deus** pela existência, pelas oportunidades concedidas, pela vida, pelos sonhos e por Sua presença constante em minha caminhada.

“Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e, através do céu, passavam
cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas
na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na
areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par
de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do
meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre
comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações
do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo
porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento.
Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi
exatamente aí que eu te carreguei nos braços.”

Dedicatória

Aos meus pais, **Pedro** e **Olivia**, pelo apoio, pela dedicação e pelo amor incondicional em todos os momentos e etapas de minha vida. Agradeço de todo coração; a vocês meu sublime amor!!!

Agradecimento Especial

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Ana Cláudia Pavarina**, pelos ensinamentos, pela compreensão, pela confiança e pelas oportunidades concedidas a minha formação; toda minha gratidão, meu respeito e minha admiração.

À minha amiga **Ana Cláudia**, todo meu agradecimento pela amizade, pelo respeito, pelo convívio, pelo exemplo e pela confiança em mim depositada. Muito obrigado!!!

Agradecimentos Especiais

À minha co-orientadora Prof^a. **Denise Madalena Palomari Spolidorio**, pela atenção, pelo ensinamento e pela confiança carinhosa que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Prof^a. **Ana Lucia Machado**, pela amizade e pelo exemplo de competência, de esforço e de profissionalismo, que torna demasiada minha admiração.

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, **Carlos Eduardo Vergani e Eunice Teresinha Giampaolo**, pelo apoio, pela amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao meu orientador de Iniciação Científica **Luis Antônio de Arruda Camargo**, pela dedicação e pelo incentivo.

Aos meus irmãos **Emerson e Eder**, por estarem sempre ao meu lado, apoiando minha caminhada.

Agradecimentos Especiais

Aos meus amigos do curso de Mestrado, **Ana Carolina, Ana Paula, Anelise, Andréa, Anne, Daniela, João Gustavo, José Maurício, Juliana, Karina, Luciano, Marcelo, Mariana, Matheus, Michael e Roberta**, pela disponibilidade e pelo convívio amigável em todos os momentos dessa trajetória.

As minhas amigas **Mariana e Kátia**, por estarem sempre presentes e por serem essas pessoas tão especiais.

Aos amigos do Doutorado, principalmente às amigas **Karin, Nara, Polyanna, Vanessa e Rosângela**, pela amizade, pelo auxílio, pela competência, pelo exemplo e pelo convívio feliz.

À turma 74 da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos meus amigos **Kátia, Aline, André, Andréia, Caio, Carina, Camila, Evelyn, Nancy, Rodrigo e Sandra** cuja companhia fez da minha graduação os melhores anos da minha vida.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – **UNESP**.

Aos **professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, que muito contribuem em minha formação.

Aos amigos, aos estagiários e aos funcionários do Laboratório de Patologia, em especial à **Andréia, Carina, Cristiane Duque, Débora, Fabíola, Juliana Rico, Juliê, Sabrina e Thais**, pela companhia e pela amizade.

Aos estagiários da Disciplina de Prótese Parcial Removível, em especial à **Larice**, pela amizade, e pelo auxílio prestado.

Aos alunos de graduação, em particular, a turma 77, e especialmente à **Melina** e à **Cíntia**, pela amizade e por contribuírem em minha formação.

Agradecimentos

Aos **funcionários** desta instituição, em especial aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, aos da clínica de Pós-Graduação, aos da Biblioteca e aos da Seção de Pós-Graduação, pela atenção e solicitude prestada.

À **ACECIL** de Campinas, pela generosidade na prestação de serviço a este trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (**ESALQ** – USP), de Piracicaba, em especial ao professor **Elliot Watanabe Kitajima**, por permitir a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura desta pesquisa.

Ao Professor **Romeu**, pela realização da análise estatística desta Dissertação.

À **Ana Maria**, pelas correções de Português deste trabalho.

À **FAPESP**, pela bolsa concedida para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste acontecimento.

Minha eterna gratidão

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3. PROPOSIÇÃO.....	70
4. MATERIAL E MÉTODO.....	72
5. RESULTADO.....	95
6. DISCUSSÃO.....	114
7. CONCLUSÃO.....	132
8. REFERÊNCIAS.....	134
RESUMO.....	145
ABSTRACT.....	148

1 Introdução

Durante a fase de controle posterior, observa-se, muitas vezes, falta de adaptação entre as próteses removíveis e os tecidos subjacentes devido à reabsorção do rebordo alveolar residual. Nesses casos, há necessidade de reembasamento das bases, que pode ser realizado por meio de duas técnicas distintas: reembasamento mediato e reembasamento imediato. O reembasamento imediato proporciona algumas vantagens em relação ao método convencional, dentre as quais podem ser citadas a menor complexidade para sua realização, a rapidez na execução e o custo mais acessível. Além disso, os pacientes não necessitam permanecer sem as próteses como ocorre no reembasamento mediato durante a realização das etapas laboratoriais. Apesar dessas vantagens e da aceitação desse método pelos profissionais, pouca informação sobre os materiais reembasadores imediatos tem sido encontrada na literatura. Dessa forma, alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar aspectos considerados fundamentais para o correto desempenho clínico desses materiais^{2,6,14,20,21,22,44,47,49,67,68,72,73}.

Tendo em vista que as próteses são constantemente banhadas por saliva rica em proteínas, uma película é formada na sua superfície proporcionando condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos. Além disso, independentemente do tipo de acabamento utilizado, os microrganismos podem penetrar e sobreviver a uma profundidade que varia de 1,0 a 2,0 micrometros^{18,24}. Tem sido demonstrado que os materiais reembasadores autopolimerizáveis apresentam maior porosidade quando comparados com as resinas termopolimerizáveis convencionais¹⁴, o que facilitaria a colonização desses materiais por microrganismos.

Previamente ao reembasamento imediato, é realizado desgaste na superfície interna da prótese para obter espaço para o material reembasador. Durante o reembasamento, freqüentemente ocorre extravasamento da resina acrílica para a região externa da sela. A remoção desse excesso de resina altera a textura superficial, deixando a superfície irregular, áspera e rugosa. Dessa forma, muitas vezes, a prótese necessita ser encaminhada ao laboratório para um novo polimento. Essas próteses podem conter microrganismos patogênicos no interior dos poros da resina acrílica, tanto na sua superfície externa quanto na parte interna¹⁸. Powell et al.⁵⁸, verificaram que 67% de todos os materiais enviados dos consultórios odontológicos aos laboratórios de prótese estavam contaminados com microrganismos patogênicos, incluindo *P. aeruginosa* e *Streptococcus sp.*, *M. tuberculosis*, *E. coli*, entre outros. A manipulação dessas próteses nos diversos procedimentos odontológicos pode dissipar e disseminar os microrganismos pelo ambiente, na forma de aerossóis¹⁸. Esses microrganismos podem ser inalados pelo profissional, técnico de laboratório e outros pacientes, resultando em infecção cruzada entre pacientes e profissionais^{1,42}.

Além disso, tem sido relatado que as próteses são contaminadas em vários estágios durante sua confecção, podendo transmitir microrganismos para outros materiais, equipamentos odontológicos e também para os técnicos de laboratório, que manipulam esses itens contaminados^{41,42,78}. Verran et al.⁷⁶ não verificaram crescimento de microrganismos patogênicos em culturas realizadas a partir de amostras de pedra-pomes nova, indicando que as bactérias observadas nesse material são oriundas de próteses que foram polidas sem limpeza e desinfecção prévias. Esses microrganismos, presentes na pedra-pomes, podem ser transferidos para outras próteses durante o acabamento e polimento^{41,42}. Embora tenha sido observado que as bactérias isoladas a partir da pedra-pomes são oriundas da microbiota bucal⁴¹, os estudos de Wakefield⁷⁸ e Williams et al.⁸⁰ demonstraram que

tanto a pedra-pomes reutilizada como as próteses polidas com pedra-pomes contaminada podem apresentar também uma variedade de microrganismos que não pertencem a essa microbiota. Kahn et al.⁴¹ 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.

Considerando esses aspectos, os procedimentos de desinfecção são necessários para reduzir a quantidade de microrganismos presentes nas superfícies das próteses, prevenindo a propagação de doenças infecto-contagiosas entre o consultório e o laboratório de prótese.

Dentre os métodos de desinfecção de próteses, a utilização de soluções químicas como o glutaraldeído a 2%, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, iodóforo, álcool e clorexidina, tem sido recomendada^{11,13,18,33,46,48,65}. Entretanto, há vários inconvenientes relatados com a utilização desses agentes químicos para a desinfecção de próteses^{4,69}. O glutaraldeído, apesar de possuir ação bactericida, não deveria ser utilizado para desinfecção de próteses, uma vez que, como a resina é porosa, essa solução ficaria impregnada nas porosidades, sendo difícil sua remoção, o que resultaria em efeito irritante aos tecidos bucais¹. A utilização de hipoclorito de sódio, efetiva para desinfecção, vem sendo limitada devido aos efeitos deletérios que pode ocasionar, como o branqueamento das bases acrílicas e corrosão dos componentes metálicos das próteses⁷. Além disso, a descoloração de bases de próteses pela utilização de soluções à base de clorexidina e a redução da resistência à flexão após a desinfecção por imersão em álcool têm sido relatadas^{3,4}.

Porém, se a prótese apresentar alto grau de contaminação, a desinfecção realizada somente por imersão pode não ser completamente efetiva. Considerando esse aspecto, alguns estudos recomendaram a escovação da prótese com solução desinfetante ou

sabão antes dos procedimentos laboratoriais para remoção de resíduos orgânicos, permitindo uma atuação mais efetiva da solução desinfetante^{13,48}. No entanto, a remoção mecânica dos microrganismos pela escovação, mesmo quando associada a soluções desinfetantes, é dificultada pelas irregularidades presentes na superfície das próteses.

Além da imersão em solução desinfetante, um outro método que tem sido recomendado para a desinfecção das próteses é a irradiação com microondas^{8,9,57,62,79}. Da literatura disponível, a utilização das microondas na odontologia como método de prevenção de contaminação cruzada ainda é muito restrita. No entanto, há estudos que apontam as microondas como método para desinfecção de alimentos²³, lentes de contato^{34,63}, materiais microbiológicos laboratoriais^{12,43}, roupas íntimas contaminadas com *C. albicans*²⁸, lixo hospitalar³⁵, corantes utilizados na indústria cosmética³⁹ e instrumentos utilizados em medicina e odontologia^{36,64,74}.

No forno de microondas caseiro, cuja frequência normalmente é de 2450 MHz, a eletricidade passa por um tubo de magnetron para produzir as microondas em uma radiação eletromagnética com comprimento de onda de aproximadamente 10 cm. Essas microondas são canalizadas para um ventilador que as distribui em uma cavidade no interior do forno, contendo alguma substância, geralmente alimentos¹². O aquecimento pela irradiação por microondas é fundamentado no princípio de que as microondas são absorvidas por substâncias dielétricas em uma solução, como por exemplo a água presente em alimentos ou em células biológicas. Quando esse fenômeno ocorre, o calor é gerado pela colisão e pela fricção entre as substâncias dielétricas que rotacionam vigorosamente para se orientarem na direção no campo elétrico das microondas (cerca de 2.450 milhões de vezes por segundo). Portanto, o calor gerado é proveniente de uma perda dielétrica, e o aumento da magnitude dessa perda tende a converter a energia de microondas em maior quantidade de calor. Dessa forma, a absorção das

microondas durante a irradiação promove uma alta energia interna nas moléculas dielétricas, produzindo uma elevada temperatura interna no material irradiado⁷⁷.

Rohrer e Bulard⁶² demonstraram que a exposição de próteses contaminadas com *S. epidermis*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *B. subtilis* e *C. albicans* à energia de microondas por 10 minutos a 720 W foi efetiva para eliminação dos microrganismos. No entanto, a esterilização somente foi observada quando as próteses foram acopladas a um dispositivo rotacional tridimensional. Entretanto, esse dispositivo não está comercialmente disponível. Webb et al.⁷⁹ demonstraram que o forno de microondas caseiro convencional pode promover uma redução nos microrganismos nas próteses totais inoculadas com *C. albicans* e *S. gordonii* após 6 minutos de exposição a uma potência de 350 W. Baysan et al.⁹ avaliaram a efetividade de diferentes métodos de desinfecção de materiais reembasadores resilientes contaminados com *C. albicans* e *S. aureus*. Três tipos de tratamentos foram avaliados: corpos-de-prova foram deixados a seco por 5 horas, irradiados por 5 minutos a 650 W (a seco) ou imerso em solução de hipoclorito de sódio. Os três métodos de desinfecção dos materiais reembasadores demonstraram relativa eficácia, sendo que o hipoclorito de sódio e a irradiação com microondas promoveram uma maior redução na contagem de células. Além disso, os autores observaram que o hipoclorito de sódio foi levemente mais efetivo para a desinfecção que a irradiação por microondas. Mais recentemente a energia de microondas foi utilizada como coadjuvante no tratamento de pacientes com candidose⁸. Foi observado que a irradiação por microondas foi efetiva para a desinfecção das próteses totais superiores pertencentes a esses pacientes. Além disso, a reinfecção das superfícies das próteses e a infecção da mucosa subjacente foram significativamente reduzidas nos pacientes cujas próteses foram irradiadas em relação aos pacientes cujas próteses foram imersas em solução de clorexidina⁸.

A análise dos estudos citados revela uma grande variação em relação à combinação tempo/potência de irradiação utilizada, bem como no tipo de microrganismo empregado para se verificar a efetividade da desinfecção com microondas. Além disso, nos estudos específicos para a desinfecção de próteses, os testes foram realizados com amostras a seco. Entretanto, os resultados de Dixon et al.²⁵ demonstraram que, quando a desinfecção foi realizada com as amostras imersas em água, houve maior efetividade, tendo em vista a ausência de crescimento do microrganismo *Candida albicans*. Além disso, outros estudos também sugerem o umedecimento dos materiais antes da irradiação em microondas para se obter uma maior efetividade no procedimento de desinfecção^{27,28,50}.

Neppelenbroek et al.⁵¹ realizaram um estudo com o objetivo de analisar a efetividade da irradiação com microondas na desinfecção de resinas acrílicas indicadas para reembasamento imediato. As amostras imersas em água foram irradiadas com uma combinação padronizada de tempo e potência (650 Watts/6 minutos), estabelecida a partir dos resultados dos autores anteriormente citados. Para a realização dos testes microbiológicos, foram utilizados quatro microrganismos considerados indicadores na avaliação de métodos de esterilização e desinfecção: *S. aureus* (gram positivo), e *P. aeruginosa* (gram negativo) *C. albicans* (fungo) e *B. subtilis* (aeróbio esporulado)¹⁹. A seguir, os corpos-de-prova foram incubados para propiciar o crescimento dos microrganismos e imersos em 200 mL de água para serem submetidos às microondas durante 6 minutos a uma potência de 650 Watts. Os resultados demonstraram que, após a irradiação, os corpos-de-prova tornaram-se estéreis, uma vez que não houve crescimento de microrganismos após dois períodos de incubação utilizados (48 horas e 7 dias)⁵¹.

Com base nos resultados dessa pesquisa, foram desenvolvidos alguns estudos com o objetivo de verificar o efeito desse

procedimento de desinfecção sobre as propriedades das resinas acrílicas e dos dentes artificiais. Perez et al.⁵⁵ avaliaram o efeito da desinfecção em microondas (650 Watts/6 minutos) sobre a dureza das resinas Kooliner e Duraliner e observaram que o procedimento de desinfecção aumentou os valores de dureza dos materiais testados. Em outro estudo⁵⁶ foi avaliado o efeito da desinfecção em microondas (650 Watts durante 6 minutos) sobre a estabilidade dimensional linear das resinas Kooliner e Ufi gel Hard em dois momentos diferentes: logo após dois ciclos de desinfecção e depois de sete ciclos. Os autores observaram que o procedimento de desinfecção promoveu uma contração nos materiais testados⁵⁶. Pavarina et al.⁵² avaliaram o efeito da desinfecção em microondas (650 Watts durante 6 minutos) sobre a resistência à flexão de cinco resinas rígidas indicadas para reembasamento imediato (Kooliner, Duraliner II, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C e New Truliner) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 550). No estudo, os corpos-de-prova foram irradiados por dois e sete ciclos de desinfecção. Os resultados demonstraram que dois ciclos de desinfecção aumentaram significativamente a resistência à flexão dos materiais Kooliner, Lucitone 550 e New Truliner. Entretanto, foi verificado que as resinas Duraliner e Ufi Gel Hard C apresentaram os valores de resistência à flexão reduzidos após a desinfecção.

Posteriormente, Campanha et al.¹⁶ investigaram o efeito da desinfecção por microondas (650 Watts durante 6 minutos) sobre a dureza Vickers de seis marcas comerciais de dentes artificiais (Dentron, Vipi Dent Plus, Postaris, Biolux, Trilux e Artplus). Os resultados demonstraram que os dentes artificiais avaliados, exceto o da marca comercial Dentron, apresentaram redução significativa na dureza após dois ciclos de desinfecção em microondas¹⁶.

Conforme observado nesses estudos, a desinfecção por microondas numa potência de 650 Watts por um período de 6 minutos foi considerada efetiva para a esterilização de resinas acrílicas⁵¹, porém esse

procedimento pode ocasionar uma pequena alteração dimensional e reduzir a resistência à flexão de algumas resinas para reembasamento imediato⁵⁶. Além disso, esse tratamento pode promover alteração na dureza de dentes artificiais utilizados para a confecção de próteses¹⁶.

Com base nesses aspectos, considerou-se necessário verificar se, reduzindo o tempo de exposição às microondas, pode ser obtido o mesmo efeito: a esterilização e/ou desinfecção de um material reembasador. Neste estudo, os corpos-de-prova foram contaminados com quatro microrganismos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) e submetidos ao procedimento de desinfecção imersos em água. A potência foi mantida constante (650 W), e foram testados tempos de exposição inferiores a 6 minutos (5, 4, 3, 2 e 1 minuto).

2 Revisão da Literatura

Carroll e Lopez¹⁷, em 1969, realizaram um estudo para avaliar a possibilidade de um efeito não-térmico de inativação de microrganismos pelas microondas. Para os procedimentos experimentais, foi utilizado um aparelho de microondas não convencional com potência de 500 W. Inicialmente, foi avaliado o efeito das alterações de pH sobre os microrganismos testados (*B. subtilis*, *E. coli* e *S. cerevisiae*). Para isso, os microrganismos foram imersos em solução tampão com pH específico. Os microrganismos também foram inoculados em alimentos (leite, suco de tomate e suco de laranja) e irradiados por períodos entre 16 e 64 minutos antes das semeaduras nas placas de Petri. Os autores observaram que não houve redução significativa do número dos microrganismos testados nas soluções com diferentes valores de pH. Não houve redução dos microrganismos *S. cerevisiae* e *E. coli* inoculados no leite e no suco de tomate após o tratamento com as microondas. Para o suco de laranja, houve uma redução progressiva do número de microrganismo com o aumento do tempo de exposição às microondas. A variabilidade dos resultados obtidos levou os autores a sugerirem que a composição química da suspensão irradiada e a das células microbianas podem explicar os efeitos não térmicos provenientes das microondas. Além disso, os autores relataram que existe a possibilidade da lise celular de um microrganismo ocorrer devido à rápida oscilação das cargas celulares elétricas negativas em decorrência de interação com o campo eletromagnético das microondas. Essa oscilação, segundo os autores, pode exceder os limites elásticos da estrutura celular, promovendo seu rompimento. Foi também enfatizado que, desde que a energia das microondas é absorvida seletivamente por certas moléculas constituintes de uma célula microbiana, tais como DNA ou alguma proteína essencial,

ocorre uma desnaturação irreversível dessas estruturas e os microrganismos podem ser inativados em níveis baixos de calor.

Katberg Jr.⁴², em 1974, realizou um estudo para determinar a presença de contaminação cruzada entre pacientes com próteses totais, incluindo próteses imediatas, durante a fase de acabamento no laboratório de prótese. Suspensões obtidas de próteses demufladas foram semeadas em placas de Petri. Após polimento com pedra-pomes, metade das próteses foi imersa em cloreto de amônia quaternária por 15 minutos e a outra metade não foi desinfetada. Novas suspensões obtidas das próteses foram semeadas em placas de Petri e incubadas a 37°C por 24 e 48 horas. Os resultados evidenciaram que houve uma redução do número de colônias viáveis para as próteses imersas em solução desinfetante. Por outro lado, a pedra-pomes sempre apresentou contaminação. Além disso, foi observada pouca contaminação após a demuflagem, sugerindo que a incorporação de microrganismos ocorreu nos procedimentos subseqüentes a essa fase. Entre as possíveis causas da contaminação, o autor citou: 1- ajuste e reparo das próteses; 2- as mãos, o nariz e a boca dos técnicos de laboratório; 3- os aerossóis e as substâncias contaminadas no laboratório; 4- contaminação da água da torneira. O autor concluiu que os resultados obtidos indicam a presença de contaminação de paciente para paciente e de técnico para paciente via laboratório. Segundo o autor, a utilização de medidas simples, como esterilização da roda de pano e da pedra-pomes em autoclave e imersão das próteses em solução desinfetante por 15 minutos, pode reduzir os riscos de transmissão de doenças entre o consultório odontológico e o laboratório de prótese.

O efeito das condições de polimerização e do tipo de material na distribuição do peso molecular e do conteúdo de monômero residual de resinas acrílicas auto e termopolimerizáveis foi avaliado por

Beech¹⁰, em 1975. Segundo o autor, o peso molecular é uma característica importante na determinação das propriedades do material como resistência à tração, ao impacto e à fadiga. O autor relatou que as resinas autopolimerizáveis apresentam propriedades inferiores relacionadas ao baixo peso molecular e/ou ao alto conteúdo de monômero residual. As amostras avaliadas demonstraram um peso molecular mais alto que o polímero original, entretanto, a amostra quimicamente ativada apresentou um peso molecular inferior. Após o armazenamento por 7 dias e o aquecimento em água a 100°C por 2 horas, a resistência à flexão das amostras polimerizadas quimicamente aumentou em níveis comparáveis aos das resinas termopolimerizáveis. O autor também observou uma diminuição no peso molecular e um aumento na largura de distribuição do peso molecular, além de um aumento na porcentagem de polímeros com pesos inferiores a 10⁵. Assim, a resistência à flexão inferior das resinas autopolimerizáveis foi relacionada ao conteúdo de monômero residual e não ao peso molecular. Além disso, o aumento da relação tempo/temperatura de polimerização proporcionam aumento da formação de polímero e da velocidade da reação, respectivamente, resultando em um maior grau de conversão do monômero.

Culkin e Fung²³, em 1975, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na eliminação de microrganismos presentes em alimentos e seu mecanismo de ação sobre os microrganismos irradiados. Para a realização dos experimentos, as bactérias selecionadas (*E. coli* e *S. typhimurium*) foram inoculadas em uma concentração de 10⁷ org/mL nos alimentos líquidos (sopa de tomate, sopa de vegetais e caldo de carne). O número de células viáveis tanto nos alimentos crus quanto nos cozidos, para porções individuais (200 mL) ou triplas (600 mL), foi determinado por semeadura em placas de Petri incubadas a 37°C por 24 horas. A irradiação das sopas inoculadas foi realizada em períodos

superiores a 150 segundos para porções individuais e a 10 minutos para as porções triplas. Tiras de papel térmicas foram utilizadas nas mensurações das temperaturas das sopas irradiadas. Os resultados evidenciaram uma redução progressiva na viabilidade das bactérias avaliadas com o aumento do tempo de exposição às microondas. Foi observado padrão similar para o aquecimento das sopas avaliadas com maior temperatura observada na região intermediária. Segundo os autores, se a ação letal da energia de microondas fosse atribuída ao efeito do calor produzido pelas ondas, seria esperado que os microrganismos da região de maior temperatura apresentassem os menores valores de viabilidade microbiana. Entretanto, foi evidenciado que os microrganismos nas regiões superficiais, de temperatura inferior, apresentaram menores níveis de viabilidade quando comparado às regiões intermediárias, que apresentaram maior temperatura. Considerando esses aspectos, os autores sugeriram que o mecanismo de ação das microondas sobre os microrganismos pode ser explicado não somente por um efeito térmico, produzido pelo calor gerado com a irradiação, mas também por um efeito não-térmico. Segundo os autores, os resultados do estudo não indicaram a exata natureza dos efeitos letais das microondas às bactérias (molecular, mecânica ou aquecimento seletivo).

Latimer e Matsen⁴³, em 1977, realizaram uma série de experimentos para avaliar as microondas na inativação de bactérias patogênicas presentes em laboratório de análises clínicas microbiológicas. As bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas selecionadas (*B. subtilis*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Alpha streptococcus* do grupo D, *Enterococcus* e *S. epidermidis*.) foram inoculadas em 50 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) e incubadas pelo período noturno a 35°C. Após a incubação, as culturas foram irradiadas por 15, 30, 45 ou 60 segundos.

Essas amostras foram diluídas e semeadas em placas de Tryptic Soy Agar (TSA). Além disso, tiras de papel com esporos de *B. stearothermophilus* foram irradiadas por um dos seguintes tempos experimentais: 15, 30, 45 e 60 segundos e 2, 3, 4 e 5 minutos. Após a exposição, as tiras foram inoculadas em TSB e incubadas a 56°C por 72 horas. Em outro experimento, suspensões de esporos de *B. subtilis* foram irradiadas em tempos entre 15 segundos e 11 minutos e semeadas em placas de TSA para quantificação dos esporos viáveis. Além disso, os autores testaram a efetividade das microondas nos tempos de exposição de 5, 10, 15 ou 20 minutos na desinfecção de embalagens autoclaváveis contendo placas de Petri plásticas com meio de cultura contaminado. Em seguida, as tiras foram incubadas em meio de TSB por 48 horas a 35°C. Os resultados desse estudo evidenciaram esterilização das bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas selecionadas após 60 segundos de exposição às microondas. Por outro lado, as tiras de papel contaminadas com *B. subtilis* não foram esterilizadas após 11 minutos de irradiação em microondas. Além disso, os autores concluíram que um tempo de exposição de 5 minutos às microondas foi adequado para assegurar a eliminação dos esporos de *B. stearothermophilus* presentes nas culturas puras e que esse tempo também promoveu uma esterilização das placas contaminadas.

Fitzpatrick et al.²⁷, em 1978, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de microrganismos patogênicos. Para os experimentos foram utilizados tubos de ensaio com suspensão salina de *S. aureus*; esporos a seco de *B. subtilis* ou tiras umedecidas com esporos de *B. subtilis*. Inicialmente, cada condição avaliada foi submetida a cinco irradiações sucessivas por 12 segundos a 1000 W. Esses experimentos demonstraram que o tratamento, apesar de ter sido efetivo para eliminar formas metabólicas (*S. aureus*), foi insuficiente para inativar as formas esporuladas. A partir desses

resultados, os autores realizaram experimentos com tiras contaminadas com esporos (*B. stearothermophilus* e *B. subtilis*) e umedecidas em água destilada. Em seguida, essas tiras foram irradiadas por períodos superiores a 15 e 30 minutos. Os procedimentos com água foram realizados devido ao conhecido efeito da água na coagulação de proteínas no processo de esterilização. No entanto, ainda foi observada cultura positiva para os esporos testados. Com base nessas observações, culturas desses esporos foram incubadas em outros tubos de ensaio abertos. Entretanto, experimentos demonstraram crescimento em todas as culturas avaliadas. Devido a essas observações, os autores realizaram experimentos com tubos de ensaio vedados com roscas e verificaram que não houve crescimento nas culturas avaliadas pelo período de 7 dias. Foi concluído que a esterilização satisfatória por meio da irradiação em microondas apresentou-se viável quando o conteúdo a ser irradiado foi adequadamente selado. Além disso, com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a esterilização ocorrida foi devido a um efeito puramente térmico.

Hume e Makinson³⁶, em 1978, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas e da utilização de óleos lubrificantes bactericidas para peças de mão na esterilização odontológica. Para os experimentos com as microondas, tiras de papel com esporos de *B. stearothermophyllus* foram irradiadas por tempos de até 64 minutos e incubadas por 24 horas. Instrumentais odontológicos (alicates ortodônticos, alargadores endodônticos, escovas de profilaxia e brocas carbide) foram contaminados com *S. aureus*, irradiados por tempos de até 12 minutos e incubados a 37°C por 24 horas. Em outro experimento, alicates ortodônticos e peças de mão, contaminados com vírus herpes simples, foram irradiados por até 12 minutos. Além disso, várias marcas de óleos lubrificantes foram aplicadas em meios de cultura com *S. aureus* incubados a 37°C por 24 horas. Os resultados demonstraram que a

exposição às microondas não foi efetiva na inativação dos esporos em até 64 minutos de exposição. Além disso, foi observado crescimento bacteriano mesmo após 12 minutos de exposição. O crescimento viral também foi positivo para todos os alicates irradiados, mas apresentou-se negativo para as peças de mão lubrificadas e irradiadas por 12 minutos. Foi demonstrado que os óleos lubrificantes avaliados, exceto o KaVo All-Air, apresentaram apenas um efeito bacteriostático. Os autores concluíram que a ineficácia na esterilização pela irradiação por microondas pode ser atribuída ao fato dos microrganismos terem sido protegidos das microondas pela superfície metálica dos instrumentos odontológicos, bem como pelo fato dos experimentos terem sido realizados com os microrganismos a seco, não sendo avaliados os efeitos do calor proveniente do meio circundante e das alterações ocorridas na água presente no próprio microrganismo.

Dreyfuss e Chipley²⁶, em 1980, avaliaram os efeitos subletais das microondas em células de *S. aureus*. Culturas desses microrganismos em meio líquido foram irradiadas por 10, 20, 30 e 40 segundos em forno de microondas a 2,45 MHz. Células não irradiadas foram utilizadas como controle e outras células foram submetidas a tratamento térmico em banho-de-água como parâmetro de comparação. Os microrganismos foram cultivados em caldo nutriente e sua viabilidade avaliada quantitativamente por contagem. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 ml de água destilada para em seguida serem lisadas sob pressão. Os lisados e paredes celulares de células irradiadas durante 20 segundos foram analisados quanto a atividades enzimáticas e quanto ao conteúdo de proteínas totais, analisado por meio de um sistema colorimétrico que se baseia na técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit). Algumas enzimas das células irradiadas tiveram sua atividade enzimática aumentada e outras, diminuída, tanto em relação ao grupo controle quanto em relação às células aquecida em banho-de-água.

Os autores afirmaram também que houve maior lise das células irradiadas resultando em uma maior concentração de proteínas nos extratos obtidos a partir dessas células. Os autores puderam concluir que as microondas afetaram as atividades metabólicas de *S. aureus* de uma maneira que não pôde ser explicada somente por efeitos térmicos. Os autores destacaram a atividade da enzima termonuclease que está relacionada com a estimulação de crescimento das culturas até temperaturas próximas ao ponto de inativação térmica, que é a temperatura em que há uma redução significativa no número de células. De acordo com os resultados obtidos para essa enzima, altas atividades enzimáticas corresponderam a um grande número de células viáveis e baixas atividades corresponderam a baixos números de células.

Sanborn et al.⁶⁶, em 1982, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da irradiação por microondas na esterilização de recipientes plásticos para cultura de células. Recipientes estéreis de várias marcas e dimensões foram inoculados com meios de cultura contendo um dos seguintes microrganismos: *E. coli*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. lútea*, *C. equi*, *B. alvei*, *B. globigii* e *S. faecium*. Após a contaminação, os recipientes foram submetidos às microondas nos tempos de exposição de 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 ou 600 segundos. Após a irradiação, as superfícies dos recipientes foram recobertas com meio de cultura, incubadas a 37°C por 48 horas e avaliadas quanto à presença de crescimento bacteriano. Além disso, os autores avaliaram se os recipientes de culturas poderiam ser lavados, esterilizados por microondas e reutilizados. Para esses experimentos, recipientes utilizados foram escovados com detergente para remoção de células aderentes e enxaguados quatro vezes com água deionizada. Após 2 horas em temperatura ambiente, os recipientes foram irradiados durante os tempos de exposição previamente selecionados. Em seguida, vários tipos de células foram colocados nos recipientes. O crescimento dessas

células foi comparado com o de outras colocadas em recipientes novos quanto à capacidade de aderência e formação de monocamadas. Os resultados demonstraram que, após 3 minutos de irradiação, todos os recipientes contaminados com as bactérias selecionadas foram esterilizados. Não foi observada diferença no crescimento das células colocadas nos recipientes estéreis e não reutilizados em relação ao crescimento nos recipientes reutilizados após exposição às microondas.

Inoue et al.³⁸, em 1983 avaliaram o efeito do conteúdo de monômero residual sobre as propriedades viscoelásticas de uma resina termopolimerizável (Acron) e cinco resinas autopolimerizáveis (Repairsin, Cast resin, Palapress, Pour-n-cure e Pronto II). Além disso, os autores também avaliaram o efeito de um tratamento térmico em água a 100°C por 1 hora sobre a viscoelasticidade e quantidade de monômero residual das resinas acrílicas testadas. O conteúdo de monômero residual foi verificado por cromatografia gasosa, e a leitura da viscoelasticidade dos materiais foi realizada em um viscoelastômetro dinâmico com temperatura entre -120 e 130°C. Cada corpo-de-prova foi pesado e armazenado em dessecador por 3, 7 ou 14 dias a $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ previamente aos experimentos. Os resultados demonstraram que a quantidade de monômero residual das resinas autopolimerizáveis foi de 3,6 a 4,7 vezes maior que a da resina termopolimerizável. A porcentagem do monômero residual das resinas autopolimerizáveis diminuiu com o armazenamento após a polimerização. Após o tratamento térmico a 100°C por 1 hora as propriedades viscoelásticas das resinas autopolimerizáveis melhoraram e a quantidade de monômero residual para todos os materiais avaliados foi diminuída.

Rohrer e Bulard⁶², em 1985, realizaram um estudo para avaliar a efetividade das microondas na esterilização de próteses e de instrumentos odontológicos. Os autores realizaram as experiências com

os microrganismos inoculados em tubos de ensaio contendo meio de Brain-Heart Infusion, em próteses com metal ou totalmente em resina acrílica, em brocas metálicas e em peças de mão. As amostras foram contaminadas com 10^5 org/mL de cada um dos seguintes microrganismos: três tipos de bactérias não esporuladas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*), uma bactéria aeróbica esporulada (*B. subtilis*), uma bactéria esporulada anaeróbica (*C. histolyticum*), um fungo (*C. albicans*) e dois vírus (pólio tipo 1 e herpes simples tipo 1). Para as irradiações no forno de microondas, as amostras foram ou não fixadas a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores. As suspensões microbianas nos tubos, as próteses, as fresas dentárias e as peças de mão contaminadas com as suspensões bacterianas e fúngica foram submetidas às microondas a uma potência de 720 W, nos tempos experimentais de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 15 minutos, e incubados a 37°C. A bactéria *B. subtilis* foi também inoculada em tiras de papel irradiadas por 20 minutos. O crescimento dos microrganismos foi avaliado para todos os materiais após 24 e 48 horas pela análise da turvação do meio e crescimento de colônias em placas de Petri. Para a irradiação das próteses, duas condições foram avaliadas para os testes de estabilidade dimensional: as próteses foram mantidas por 15 minutos em água ou foram mantidas a seco, antes de serem irradiadas. As peças de mão contaminadas com vírus foram irradiadas por 0, 1, 3, 5, 8 e 10 minutos. Segundo os autores, os resultados obtidos quando o dispositivo rotacional tridimensional foi utilizado evidenciaram maior efetividade no tratamento com microondas. Os tubos de ensaio contaminados com a mistura de quatro bactérias aeróbicas e *C. albicans* não demonstraram crescimento após 10 minutos de irradiação. A esterilização da bactéria esporulada anaeróbica *C. histolyticum* ocorreu após 3 minutos de irradiação. As tiras de papel com a bactéria esporulada aeróbica *B. subtilis* demonstraram esterilização apenas após 15 minutos de irradiação. As fresas dentárias, quando imersas em suspensão de quatro bactérias aeróbicas e expostas

às microondas por 10 minutos, apresentaram esterilização. As peças de mão contaminadas com a mesma suspensão bacteriana foram esterilizadas após 10 minutos de irradiação. Já as peças-de-mão contaminadas com vírus apresentaram-se estéreis após 3 minutos de irradiação. As próteses contaminadas com as suspensões individuais de quatro bactérias aeróbicas e do fungo apresentaram esterilização para todos os microrganismos testados após 8 minutos de exposição às microondas. Quando uma mistura de suspensões desses microrganismos foi utilizada, a esterilização das próteses foi observada após 10 minutos de irradiação. Não foram observadas alterações dimensionais tanto para as próteses imersas previamente em água quanto para as mantidas a seco e expostas às microondas durante 8 minutos por 100 vezes. Para uma esterilização efetiva de materiais odontológicos, os autores sugeriram a irradiação por microondas associada à utilização do dispositivo tridimensional desenvolvido nesse estudo.

Williams et al.⁸⁰, em 1985, realizaram um estudo para quantificar e avaliar as espécies de bactérias presentes na pedra-pomes em quatro laboratórios de prótese. Dez amostras de pedra-pomes de cada laboratório avaliado foram coletadas, semeadas em placas de Petri e incubadas. A identificação das espécies foi realizada com base nos resultados de testes bioquímicos e das características morfológicas das colônias. Os autores observaram uma predominância de microrganismos patogênicos nas amostras de pedra-pomes, incluindo os gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxellae* e *Alcaligenes*. Além disso, foram sugeridos alguns procedimentos para reduzir a contaminação nos laboratórios, como utilização de doses únicas de pedra-pomes ou a mistura da pedra-pomes a uma solução desinfetante nos casos de utilização da roda de pano. Os autores enfatizaram que a contaminação é um fator a ser considerado especialmente nos casos de manipulação de próteses totais imediatas e de próteses pertencentes a

pacientes com doenças crônicas debilitantes. Com base nos resultados que evidenciaram a presença de alto número de bactérias nas amostras de pedra-pomes analisadas, os autores concluíram que os procedimentos de higiene, desinfecção e esterilização, adotados nos laboratórios de prótese e nos consultórios odontológicos, não são considerados aceitáveis.

Em 1985, Young et al.⁸³ avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de aparelhos nasais para sedação com óxido nitroso. Os autores utilizaram o mesmo forno de microondas com dispositivo rotacional tridimensional idealizado por Rohrer e Bulard⁶². Inicialmente, os aparelhos nasais foram esterilizados com óxido de etileno e contaminados com rinovírus, vírus parainfluenza tipo 3, adenovírus tipo 1 e vírus herpes simples tipo 1. Os aparelhos inoculados foram irradiados por 0, 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos. Após a desinfecção, os microrganismos residuais foram removidos das áreas contaminadas dos aparelhos por meio de enxágüe com meio de cultura. Duas amostras de 50 microlitros desse meio foram diretamente colocadas em duas monocamadas de células e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas da solução resultante. A eliminação dos vírus testados após a irradiação em microondas foi avaliada pela observação da redução da formação de placa (CPE) nas monocamadas infetadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Além disso, com o objetivo de avaliar a possibilidade de efeitos deletérios por exposições sucessivas às microondas, um aparelho nasal foi irradiado por 25 vezes com intervalos de 5 minutos entre cada exposição. De acordo com os resultados, após 4 minutos de exposição às microondas, todos os vírus avaliados foram completamente inativados. O aparelho nasal exposto por 25 vezes consecutivas às microondas não evidenciou nenhuma alteração quanto à textura e flexibilidade. Os autores concluíram que os aparelhos nasais para sedação com óxido nitroso contaminados por vírus podem ser

adequadamente esterilizados por meio de um forno de microondas convencional apropriadamente modificado por um dispositivo rotacional tridimensional.

Com base em um estudo prévio⁶² para esterilização de instrumentos odontológicos por irradiação em microondas, Rohrer et al.⁶³, em 1986, desenvolveram um método para esterilização de lentes de contato hidrófilas. Previamente à inoculação, as lentes de contato utilizadas foram esterilizadas em autoclave. Em seguida, dez lentes de contato foram contaminadas com um dos seguintes microrganismos (10^6 org/mL): *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *A. fumigatus* e *C. albicans*. Após a contaminação, as lentes foram transferidas para casulos de hidratação estéreis e colocadas em embalagens autoclaváveis, que foram fixadas no dispositivo tridimensional rotatório previamente desenvolvido pelos autores Rohrer e Bulard⁶². As embalagens contendo as lentes de contato foram irradiadas a 700 W por 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos. Após a irradiação, as lentes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura e incubadas a 37°C por 24 horas. O crescimento dos microrganismos foi avaliado por análise da turvação do meio de cultura nos tubos de ensaio. As amostras foram semeadas em placas de Petri e incubadas a 37°C por 48 horas ou 7 dias, de acordo com o microrganismo testado. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Para a avaliação das possíveis alterações nas propriedades refringentes das lentes de contato após a irradiação, um par de lentes para hipermetropia foi exposto às microondas durante 10 minutos por 101 vezes. Além disso, um par de lentes de contato submetido a este tratamento foi preparado para avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados evidenciaram que a exposição às microondas resultou em desidratação das lentes de contato após um período de aproximadamente 2 minutos. Porém, uma nova hidratação com solução salina restaurou a forma e a aparência das lentes

sem alterações microscópicas. Foi observada a presença de pequenas partículas nas superfícies das lentes de contato testadas para a refringência. A MEV demonstrou pequenas partículas de detritos com estrutura cristalina em ambas lentes avaliadas. Os autores observaram que, para a esterilização completa das bactérias avaliadas, foram necessários 8 minutos de irradiação em microondas. Já para a eliminação dos dois fungos patogênicos avaliados (*C. albicans* e *A. fumigatus*), 4 minutos de exposição às microondas foram suficientes para promover inativação. Os autores atribuíram a efetividade de esterilização em microondas a um possível efeito “não térmico” proveniente dessa irradiação. Esse efeito seria explicado pela absorção das microondas em vários graus por moléculas fundamentais dos microrganismos, tais como os ácidos nucléicos.

Em 1987, Jeng et al.⁴⁰ avaliaram a possibilidade de desenvolvimento de um ciclo de esterilização em baixa temperatura, por meio de irradiação por microondas de esporos secos. O objetivo do trabalho foi determinar a possível existência de efeitos não-térmicos das microondas nos microrganismos. O interior de ampolas de vidro foram contaminadas com 10^7 /mL de suspensão (10 μ L) de *B. subtilis* subsp. *niger*. As ampolas foram incubadas em umidade relativa de 33% a 22°C por 7 dias. Foi utilizado um forno de microondas (4 kW), cuja potência foi controlada automaticamente por um sistema computadorizado externo. Também foi utilizado um forno elétrico de calor seco convencional, que foi pré-aquecido aproximadamente à máxima temperatura experimental desejada, a qual foi medida por meio de um termômetro de mercúrio calibrado. Assim, condições experimentais foram proporcionadas para que os esporos secos fossem simultaneamente expostos às microondas e ao calor seco convencional, com perfil de temperatura aproximadamente idêntico. Um modelo especial de termômetro foi usado para medir a temperatura das ampolas durante cada experimento. Apenas um par de

ampolas foi exposto a cada experimento, uma no forno de microondas e outra no forno convencional. O sistema computadorizado ajustava a potência das microondas em tempo real, de modo que a ampola do forno de microondas aquecesse na mesma proporção que a ampola do forno convencional. Após a exposição, as amostras foram resfriadas com uma corrente de ar comprimido filtrado. Em seguida, 5 mL de água destilada estéril foi adicionada às amostras, que foram sonicadas por 5 min. Duplicatas de 1 mL foram dosadas pelo método padrão de plaqueamento em Trypticase Soy Agar. Todas as placas foram incubadas a 30-35°C por 48 h. Os resultados demonstraram que as temperaturas alcançadas durante os experimentos foram de 107, 117, 130 e 137°C. A diferença de temperatura entre os as duas fontes de calor foi menor que 2°C. Foi verificado um baixo grau de letalidade para temperaturas abaixo de 117°C, as quais não foram efetivas para esterilização a seco. O tempo necessário para se alcançar a temperatura máxima a 130°C e 137°C foi de 20 minutos. Uma vez atingida a temperatura experimental máxima, os esporos foram inativados exponencialmente. O tempo total necessário para reduzir 10^5 esporos foi de 75 e 48 minutos a 130 e 137°C, respectivamente. Não houve diferença significativa entre o aquecimento convencional e por microondas na inativação dos esporos em todas temperaturas estudadas. Os valores D (tempo necessário para reduzir a população a 90% em uma temperatura) a 117, 130 e 137°C foram estimados em 88, 14 e 7 minutos, respectivamente. O valor Z (aumento na temperatura requerido para redução de 90% em valor D) foi estimado em 18°C. Os resultados sugeriram que a atividade esporicida da energia de microondas é meramente em função do calor. Segundo os autores, efeitos não-térmicos não são significantes no processo de esterilização a seco por microondas.

Robinson et al.⁶¹, em 1987, avaliaram os efeitos de agentes de limpeza de próteses e da exposição a vapores de solventes

na alteração de cor, na resistência à flexão e na estrutura microscópica de resinas acrílicas para base de prótese. Foram utilizadas duas resinas termopolimerizáveis, Trevalon C e Metrocyl Clear, polimerizadas por 6 horas a 70°C e 3 horas a 100°C, e uma resina autopolimerizável, DeTrey Rapid Repair. As resinas foram imersas em peróxido alcalino, em hipoclorito ou em água, sob temperaturas recomendadas pelos fabricantes ou ainda, em temperaturas mais elevadas. As amostras não apresentaram alteração de cor quando imersas em qualquer das soluções preparadas nas temperaturas recomendadas. Entretanto, quando imersas nas soluções de desinfecção ou em água em temperaturas elevadas (95°C), as amostras demonstraram alteração de cor, tendo sido esse efeito mais pronunciado quando expostas a vapor de acetona, previamente às imersões. No entanto, esse tratamento em água aumentou de forma significativa a resistência à flexão das resinas avaliadas. Os resultados demonstraram diminuição na resistência à flexão quando as amostras de resina termopolimerizável foram expostas à acetona. Segundo os autores, se forem utilizados ciclos curtos ou com baixas temperaturas, uma certa quantidade de monômero residual ou que não reagiu estaria presente na prótese confeccionada. Além disso, de acordo com os autores, em todos os tratamentos de limpeza, nos quais altas temperaturas foram utilizadas, o monômero residual poderia ter causado uma dissolução local e a re-precipitação das superfícies das pérolas do polímero, resultando em alteração de cor. Foi observado, ainda, que a resina Metrocyl apresentou um aumento significativo na resistência quando imersa em água quente, possivelmente devido a um aumento no grau de polimerização.

Friedrich Jr. e Phillips²⁸, em 1988, avaliaram a efetividade das microondas na esterilização de tecidos de algodão contaminados com *C. albicans*. Amostras de tecidos de algodão para roupas íntimas femininas foram imersas em suspensão de *C. albicans*, mantidas a seco

em placas de Petri por três dias em temperatura ambiente e irradiadas em potência máxima por 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 minutos. As amostras irradiadas foram semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas a 35°C. Num segundo experimento, os mesmos procedimentos foram realizados, porém as amostras foram umedecidas com salina fisiológica estéril a cada 5 minutos de irradiação. De acordo com os resultados, a exposição do material seco às microondas não foi efetiva para eliminar *C. albicans*. Entretanto, quando as amostras foram umedecidas em salina antes das irradiações e expostas às microondas por 5 minutos ou mais, não foi observado crescimento de *C. albicans*. Dessa forma, a esterilização por microondas de roupas íntimas, desde que mantidas úmidas, foi sugerida como um método para redução de doenças recorrentes.

O efeito das microondas produzidas por dois fornos convencionais (Néon-licence Litton e Néon-type Riviera) sobre bactérias vegetativas e esporuladas foi avaliado por Najdovski et al.⁵⁰, em 1991. Suspensões aquosas de cepas vegetativas de *S. aureus*, *S. pyogenes* do Grupo A, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* e de esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* foram irradiadas a 325 ou 650 W em diferentes tempos de exposição (5, 10, 15 e 20 minutos). Adicionalmente, cepas vegetativas de *S. faecalis* e esporos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* a seco e em suspensões aquosas foram irradiados a 1.400 W, nos tempos de exposição de 3, 5, 10 e 20 minutos. Após a exposição às microondas, as amostras foram observadas microscopicamente e as culturas foram quantificadas por meio de semeadura em placas de Petri. Os resultados demonstraram que as cepas vegetativas avaliadas foram eliminadas após 5 minutos de irradiação a 650 W, exceto pelas cepas de *E. faecalis*, que foram inativadas após 10 minutos de exposição. Quando a potência de 1.400 W foi utilizada, cepas de *E. faecalis* a seco foram eliminadas após 5 minutos, e as suspensões aquosas dos esporos

bacterianos foram somente inativadas após 10 minutos (*B. subtilis*) ou 20 minutos (*B. stearothermophilus*). As suspensões a seco não foram completamente eliminadas mesmo após a exposição por 20 minutos a 1.400 W. Com base nos resultados, os autores sugeriram que os fornos de microondas convencionais podem ser utilizados para desinfecção quando em presença de uma quantidade suficiente de água.

Com o objetivo de diminuir os custos da utilização de cateteres descartáveis em pacientes que necessitam ser submetidos a cateterização urinária intermitente, Griffith et al.³¹, em 1993, realizaram um estudo para investigar a possibilidade da reutilização de cateteres de polietileno após sua desinfecção por microondas. Os cateteres foram contaminados com suspensões de *Proteus sp.* em solução tampão durante 30 segundos. A seguir, foram removidos da suspensão bacteriana, e, após secagem, foram colocados dentro de bolsas plásticas seladas. Mantidos à temperatura ambiente por uma hora, os cateteres foram, então, divididos em grupos de seis e distribuídos ao longo da bandeja rotatória de um forno de microondas doméstico. Durante a irradiação, que foi realizada durante 0, 2, 4, 6 e 8 minutos a 650 W, um recipiente contendo 300 mL de água foi mantido dentro do forno para permitir a dissipação do calor. Após a irradiação, as bolsas plásticas foram abertas e os cateteres, individualmente imersos em 6 mL de caldo Soy, tendo sido as bolsas novamente seladas durante 30 segundos para permitir o contato do meio com os cateteres. Três amostras foram coletadas da solução resultante dessa imersão no meio de cultura e plaqueadas para contagem das ufc em Agar. Um dos grupos de cateteres foi irradiado por 8 minutos durante 30 irradiações diferentes para avaliação de possíveis alterações na estrutura dos mesmos. De acordo com os resultados obtidos, a completa esterilização dos cateteres foi observada pela irradiação durante 6 minutos. Além disso, os cateteres submetidos a irradiações consecutivas não demonstraram sinais

exteriores de alteração estrutural. Os autores concluíram que a esterilização dos cateteres de polietileno utilizados para cateterização intermitente poderiam ser esterilizados por meio da irradiação de microondas, nas condições de irradiação utilizadas, ou seja, os cateteres deveriam ser irradiados durante seis minutos a 650 W, sobre uma plataforma giratória e contendo um recipiente no interior do forno com 300 mL de água durante a irradiação.

Rosaspina et al.⁶⁴, em 1994, avaliaram o efeito da irradiação de microondas na esterilização de instrumentais cirúrgicos contaminados com *C. albicans*. As amostras (50 lâminas de bisturi em aço inoxidável e 25 lamínulas de microscopia) foram contaminadas com *C. albicans* a uma concentração de 10^7 org/mL. Em seguida, as amostras contaminadas foram imersas em recipiente de vidro contendo 0,4 cm de esferas de vidro e água destilada. Esses recipientes foram irradiados a 600 W durante 1, 5, 3, ou 6 minutos. As amostras do grupo controle foram preparadas similarmente às amostras irradiadas e esterilizadas em estufa por 2 horas a 140°C ou em autoclave por 20 minutos a 121°C. Amostras adicionais foram imersas em banho de água fervente durante os mesmos tempos determinados para as exposições às microondas. Além disso, algumas amostras foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As lâminas de bisturi e de microscopia foram colocadas em contato com placas de Petri contendo Trypic Soy Agar e incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados demonstraram, para todas as amostras preparadas, uma efetiva esterilização após 2 minutos de irradiação por microondas. A análise em MEV revelou que alterações causadas pelas microondas para o microrganismo estudado foram proporcionais ao tempo de exposição testado. Quando amostras contaminadas foram colocadas em banho de água fervente por 9 minutos, foi verificada uma efetiva esterilização (inativação celular), embora não tenham sido observadas modificações na morfologia celular. Foi sugerido

que as microondas produziram efeito letal inicial sobre os microrganismos sem provocar alterações na morfologia celular. A desintegração celular foi efetiva somente quando uma irradiação em tempo de exposição prolongado foi utilizada. Como as alterações morfológicas obtidas após a exposição em microondas foram completamente diferentes daquelas verificadas após o tratamento em banho de água, os autores concluíram que, além de um efeito proporcionado pelo aumento de temperatura, as microondas também exercem um efeito mais complexo no corpo celular dos microrganismos. Esse efeito, segundo os autores, ainda precisa ser avaliado.

Chau et al.¹⁸, em 1995, realizaram um estudo para avaliar a possibilidade de penetração de bactérias na resina acrílica após curto período de exposição. Os corpos-de-prova de três resinas acrílicas foram polidos apenas em um de seus lados para simular as superfícies externa e interna (não polida) de uma prótese. Em seguida, os corpos-de-prova foram imersos por 24 horas em um meio de cultura contendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os corpos-de-prova contaminados foram, então, imersos em uma das soluções desinfetantes avaliadas (iodóforo, dióxido de cloro e hipoclorito de sódio a 5,25%) ou em uma solução salina estéril (controle) por 10 minutos. Após a desinfecção, os dois lados dos corpos-de-prova foram submetidos à coleta de material para as sementeiras em placas de Petri. As amostras foram envolvidas por gazes estéreis em várias camadas e quebradas pela metade por meio de um artifício de impacto manual. Cultivos foram feitos para as duas superfícies de fratura. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, e o número de colônias foi quantificado. Os autores observaram, pela análise das culturas, que os corpos-de-prova tratados com iodóforo ou dióxido de cloro apresentaram um número de colônias significativamente inferior ao número apresentado pelos corpos-de-prova do grupo controle. Por outro lado, os corpos-de-prova imersos em hipoclorito de sódio não

apresentaram colônias viáveis na placas de Petri. Os autores concluíram que a resina acrílica pode ser contaminada com bactérias tanto na parte externa quanto na interna e que o tratamento com hipoclorito de sódio foi eficiente para inativar esses microrganismos.

Hauser e Errington³², em 1995, realizaram um estudo para mensurar as alterações nos parâmetros do ciclo celular ocorridas durante a transição do crescimento vegetativo para a esporulação *B. subtilis*, com o objetivo de explicar o processo de divisão assimétrica verificada nesse processo. Considerando que a tendência de crescimento do microrganismo *B. subtilis* em cadeias de células impede a utilização de aparelhos automáticos para avaliação das alterações celulares ocorridas, os autores desenvolveram um método microscópico fluorescente para analisar os parâmetros do ciclo celular em células individuais. De acordo com os resultados obtidos e com as mensurações das velocidades de alongação dos prolongamentos de replicação do DNA, foi possível obter uma escala detalhada de tempo para os eventos morfológicos iniciais de esporulação. Foi observado que a passagem da fase vegetativa para esporos tem início após 60 minutos e é principalmente constituída de alterações no ciclo celular seguida de mudanças nutricionais. Segundo os autores, o estágio sensitivo previamente citado no ciclo de replicação de DNA, sem o qual a célula é incapaz de esporular, poderia representar um ponto no ciclo de divisão celular. Nesse ponto, a célula morta não conseguiu alcançar a massa de iniciação para a replicação de DNA. Os autores concluíram que o final do evento celular, representado pela formação de septos de esporos assimétrico, ocorreu quando, no ciclo celular, uma célula não induzida poderia dividir-se centralmente, uma vez que a septação é uma versão modificada da divisão celular.

Atmaca et al.⁵, em 1996, avaliaram o efeito da irradiação por microondas e da aplicação de calor convencional na reprodução de bactérias. Cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *P. acidovorans* foram cultivadas em suspensão, e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) de cada espécie foi determinado e utilizado como controle. Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão bacteriana foi irradiada por microondas a 550 W durante 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 e 30 segundos. Em seguida, cada suspensão foi diluída e cultivada em placas a 37°C por 24 horas e o valor de ufc/mL foi, então, determinado. Antes e após a irradiação, a temperatura da suspensão bacteriana foi verificada por meio de um termômetro digital. O experimento foi realizado cinco vezes para cada espécie bacteriana e para cada tempo de exposição. Também foram realizados ensaios com aplicação de calor convencional durante 16, 20, 25 e 30 segundos, tempos em que a contagem de bactéria foi reduzida significativamente. Suspensões de 5 mL de cada espécie bacteriana também foram irradiadas durante 14, 16, 18, 20, 25 e 30 segundos. Os resultados demonstraram que a redução na contagem de bactérias após a irradiação por microondas foi significativa em relação ao controle. Além disso, observaram que redução na contagem de bactérias expostas ao calor convencional foi maior em relação às amostras irradiadas por microondas quando foi utilizado 1 mL de suspensão. O aumento do volume das suspensões exacerbou o efeito destrutivo das microondas, uma vez que, após a irradiação, a contagem das suspensões de 5 mL foi significativamente menor que a das suspensões de 1 mL. Os autores concluíram que o efeito da irradiação por microondas na inativação de bactérias é diferente do efeito térmico, e que o conteúdo de líquido no meio desempenha uma função importante na absorção da energia criada pela irradiação por microondas.

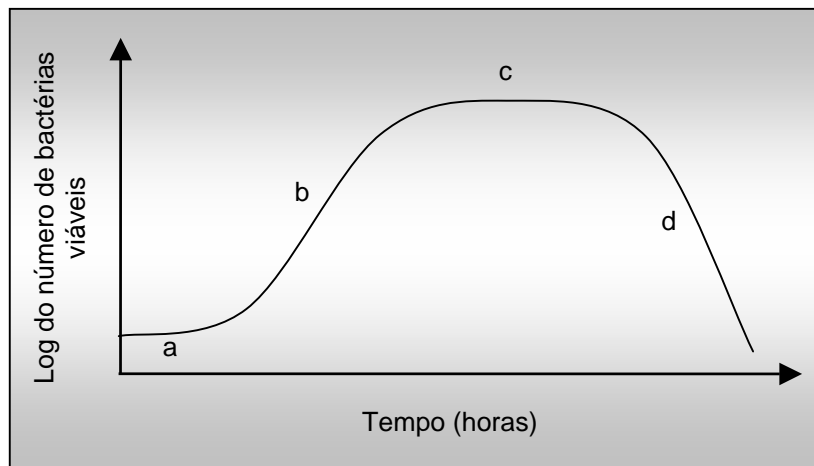
Em 1996, Cole e Robison¹⁹ relataram que, para selecionar os microrganismos adequados em uma avaliação de efetividade de tratamento químicos, é importante considerar os mecanismos de resistência germicida, bem como os conceitos de microrganismos patogênicos e indicadores. Com base em dados científicos publicados na literatura, os autores sugeriram alguns grupos de microrganismos que poderiam ser utilizados em pesquisas para avaliação da capacidade de desinfecção de agentes químicos. A utilização de formas bacterianas vegetativas Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, foi recomendada. Estes microrganismos foram relatados como resistentes à inativação química, sendo a *P. aeruginosa* mais resistente a uma ampla variedade de classes de germicidas em relação ao *S. aureus*. Segundo os autores, de acordo com métodos padrões europeus e com um estudo que avaliou nove fungos expostos a sete germicidas, a espécie *Candida albicans* foi considerada o fungo mais resistente e por isso deveria ser utilizada em pesquisas de desinfecção. Dentre os esporos bacterianos, considerados os microrganismos mais resistentes à inativação por desinfecção, os autores recomendaram a utilização de esporos de *B. stearothermophilus* ou *B. subtilis*. Os autores relataram que esses microrganismos são considerados indicadores de esterilização e devem ser testados para validar métodos de desinfecção.

Em 1996, Pelczar et al.⁵³ relataram que a temperatura elevada é um dos métodos de maior eficiência e um dos mais utilizados na destruição de microrganismos. Os autores afirmaram que o calor úmido é muito mais eficiente que o calor seco para destruir os microrganismos, pois o calor úmido causa desnaturação e coagulação das proteínas vitais como as enzimas, enquanto que o calor seco causa oxidação dos constituintes orgânicos da célula. A desnaturação de proteínas celulares ocorre com temperaturas e tempos de exposição

menores do que aqueles requeridos para a oxidação. Segundo os autores, endósporos bacterianos são as formas mais resistentes de vida. Por outro lado, as células vegetativas das bactérias são muito mais sensíveis ao calor e são usualmente inativadas dentro de 5 a 10 minutos pelo calor úmido a 60-70°C. Células vegetativas de leveduras e outros fungos são normalmente destruídos entre 5 e 10 minutos pelo calor úmido a 50-60°C. Para inativar os esporos de fungos no mesmo período de tempo são necessárias temperaturas de 70-80°C. O calor úmido utilizado para inativar os microrganismos pode ser na forma de vapor, água fervente ou à temperatura abaixo do seu ponto de ebulição.

Em 1996, Pelczar et al.⁵⁴ relataram que, para o cultivo de microrganismos, são necessários nutrientes e condição física apropriada. A pressão osmótica é uma das condições físicas que influenciam o cultivo de um microrganismo. Pode ser entendida como pressão osmótica a força com a qual a água se move através da membrana citoplasmática de uma solução contendo uma baixa concentração de solutos para outra com alta concentração de solutos. Assim, em uma solução isotônica, o fluxo de água para dentro e para fora da célula está em equilíbrio e a célula se desenvolve normalmente. Entretanto, quando o meio externo é hipertônico, com uma concentração de solutos mais alta do que no citoplasma da célula, essa perde água e seu crescimento é inibido. Ao contrário, quando a solução externa é muito hipotônica, com uma concentração de solutos menor do que na célula, a água penetra na célula provocando rompimento. Outras condições que influenciam o meio físico de um microrganismo são: temperatura, pH e atmosfera gasosa. Em condições físicas adequadas para o cultivo, as células microbianas em um sistema fechado, ou seja, em um tubo ou frasco contendo meio de cultura líquido sem renovação de nutrientes e remoção de produtos de excreção metabólico, se dividem por fissão binária, aumentando o número de células a uma taxa constante por um período de tempo, até que os

nutrientes sejam utilizados ou que os produtos de excreção metabólica se acumulem em quantidade suficiente para interromper o crescimento. Cada espécie de microrganismo tem seu tempo de geração particular, mas as várias fases de crescimento de qualquer cultura bacteriana constituem uma curva de crescimento típica ilustrada a seguir:



Essa curva demonstra que existem quatro fases distintas, com características específicas. O período inicial (a) da curva, denominado de fase lag, corresponde ao momento em que o microrganismo é inoculado no meio de cultura. Durante esse período as células não se multiplicam, porém são metabolicamente ativas, aumentam de tamanho e sintetizam novas enzimas para se adaptarem ao meio. Na fase seguinte (b – fase de crescimento logarítmico ou exponencial), a taxa de crescimento é máxima e constante, as células são aproximadamente uniformes em termos de composição química e atividades metabólicas e fisiológicas. Essa fase corresponde ao pico de atividade e eficiência fisiológica das células, em condições de crescimento balanceado. Em seguida ocorre a fase estacionária (c), durante a qual há acúmulo de produtos metabólicos tóxicos e/ou exaustão de nutrientes. Algumas células morrem enquanto outras crescem e se dividem, de modo que o número de células viáveis permanece constante. Na última fase de crescimento (d), denominada de fase de declínio ou morte, há acúmulo de produtos metabólicos inibitórios

e depleção dos nutrientes essenciais, reduzindo de forma exponencial o número de células viáveis. Dependendo da espécie, poucas células vivas resistem até o final da curva.

Os efeitos da irradiação por microondas sobre a inativação de bactérias patogênicas foram avaliados por Wu⁸¹ em 1996. Os microrganismos avaliados foram: *B. subtilis var. nigar*, *S. aureus*, *B. pumilis E₆₀₁*, *B. stearothermophilus* e *B. cereus*, sendo que os quatro primeiros são considerados bactérias indicadoras de esterilização. Os materiais selecionados para a irradiação (placas, bastões e papéis para embalagens de alimentos) foram contaminados individualmente com 10⁶ org/mL de uma das bactérias testadas. Os materiais foram divididos em vários grupos, sendo submetidos à potência alta ou média por tempos de exposição entre 0 e 50 minutos. Após a irradiação de cada grupo, os materiais foram colocados em cultura de Agar nutriente e incubados. Em seguida, o crescimento foi avaliado nos tubos após os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas para a quantificação das bactérias avaliadas. Foi observado que a eliminação de todas as bactérias sobre os itens contaminados não dependeu somente do tempo de exposição às microondas e dos tipos de materiais envolvidos, mas também da potência de irradiação utilizada e das espécies de bactérias testadas. A bactéria *B. subtilis* foi considerada como uma ótima indicadora para a desinfecção em microondas, uma vez que necessitou de maior tempo de irradiação para ser eliminada (aproximadamente 45 minutos em média potência ou 30 minutos em alta potência). Para os bastões e papéis para embalagens de alimentos testados, as outras bactérias testadas foram inativadas, em média, após 20 minutos em alta ou média potência.

Tarantino et al.⁷⁴, em 1997, avaliaram a efetividade das microondas na esterilização de espelhos odontológicos contaminados com microrganismos patogênicos (*S. aureus*, *B. subtilis* e *B.*

sterarotherophilus) inoculados em concentrações iniciais de 10^4 e 10^9 ufc/mL. Para simular condições clínicas, os instrumentos foram testados quando úmidos (irradiados imediatamente após a inoculação) e quando mantidos a seco (irradiados após 8 horas da inoculação). As irradiações foram realizadas a 650 W por 4 minutos em um aparelho de microondas em que o fabricante recomenda a imersão do material a ser irradiado em um líquido à base de aldeído. Para os experimentos, três diferentes grupos foram avaliados: 1- os instrumentos foram imersos no líquido e submetidos às microondas; 2- os instrumentos foram imersos em solução salina a 0,9% e submetidos apenas à irradiação no aparelho; e 3- os instrumentos foram apenas imersos no líquido e colocados em forno comum a 25°C por 4 minutos, não sendo irradiados. Os autores observaram que a esterilização ocorreu somente quando o líquido sugerido pelo fabricante foi utilizado (Grupo 3) ou quando a imersão no líquido foi associada às microondas (Grupo 1). A utilização de irradiação sem imersão no líquido não demonstrou uma completa eliminação dos microrganismos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, os autores sugeriram que, para se obter uma esterilização efetiva, os instrumentos deverão ser imersos no líquido proposto pelo fabricante e irradiados em microondas.

Verran e Maryan⁷⁵, em 1997, avaliaram o efeito da rugosidade na aderência de *C. albicans* em resina acrílica e elastômero. Corpos-de-prova de resina acrílica de polimetil metacrilato foram submetidos a polimento (superfície lisa) ou a desgaste manual com lixa de granulação 600 (superfície rugosa). As amostras de silicone de adição foram confeccionadas sobre uma superfície polida de resina acrílica (superfície lisa) ou sobre modelo de gesso (superfície rugosa). A rugosidade dos materiais foi mensurada por meio de um perfilômetro antes dos procedimentos de aderência. Em seguida, suspensões de *C. albicans* ($1,29 \times 10^7$ org/mL) foram adicionadas em placas de Petri

contendo um dos materiais avaliados. Após a incubação por uma hora a 24°C, os materiais foram enxaguados cuidadosamente, para que as células pouco aderidas fossem removidas. Em seguida, os materiais foram secos em temperatura ambiente, fixados com metanol e corados para possibilitar a análise microscópica e a contagem do número de células aderentes por área. Os resultados evidenciaram que não houve diferença estatisticamente significativa para o número de células verificadas em cada um dos lados das amostras com superfície lisa. As amostras com superfície rugosa apresentaram números de células significativamente mais elevados em relação aos corpos-de-prova com superfícies lisas. No entanto, as amostras de silicone com superfície rugosa demonstraram maior aderência comparados aos corpos-de-prova de resina com superfície rugosa. Os autores concluíram que um aumento da rugosidade superficial facilitou a aderência de *C. albicans* nas superfícies da resina e do silicone avaliados.

A efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de um material reembasador resiliente contaminado com microrganismos patogênicos foi avaliada por Baysan et al.⁹, em 1998. Os corpos-de-prova (2 cm X 2 cm) foram confeccionados com uma resina reembasadora resiliente (Molloplast-b) e polimerizados em microondas por 3 minutos a 650 W. Todos os corpos-de-prova foram esterilizados em autoclave, inoculados com os microrganismos testados (*Candida albicans* ou *Staphylococcus aureus*) e incubados aerobicamente a 37°C. Após três dias de incubação, o meio de cultura foi descartado e os corpos-de-prova enxaguados cuidadosamente em 10 mL de salina fosfatada tamponada (PBS) para remoção de células não aderentes. As amostras confeccionadas foram divididas em quatro grupos (três experimentais e um controle) com dez amostras cada. Três grupos experimentais foram avaliados quanto aos procedimentos de desinfecção, sendo as amostras do grupo A submetidas à desinfecção em microondas por 5 minutos a 650

W; as amostras do grupo B mantidas a seco em temperatura ambiente por 5 horas e as amostras do grupo C imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante a noite. Para o grupo controle, as amostras foram enxaguadas e deixadas em solução de PBS por 5 horas em temperatura ambiente. A seguir, os corpos-de-prova foram individualmente colocados em tubos com 10 mL de PBS e agitados por 15 minutos. A semeadura das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) foram realizadas em placas com Agar Sangue, que foram incubadas durante a noite a 37°C. Após a incubação, as colônias foram contadas e o número de ufc/mm² foi calculado. Os resultados demonstraram que o tratamento por microondas e a imersão em hipoclorito de sódio promoveram uma redução semelhante do número de microrganismos. Entretanto, o grupo do procedimento a seco apresentou uma redução do número de células viáveis significativamente inferior em relação aos demais grupos. Os autores recomendaram a utilização das microondas como um método de desinfecção efetivo e simples, uma vez que o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens para utilização na clínica odontológica, sobretudo em longos períodos de imersão, como efeitos deletérios sobre as resinas acrílicas das próteses e corrosão de componentes metálicos.

Furukawa et al.²⁹, em 1998, avaliaram a efetividade da solução de dióxido de cloro (Alcide LD) na desinfecção de reembasadores resilientes para próteses (Coe Soft e Coe Comfort). Na primeira fase do estudo, a efetividade das técnicas de spray e imersão em dióxido de cloro foi analisada para seis grupos experimentais (n = 14). Cada grupo consistiu de dez amostras para avaliação da efetividade do dióxido de cloro e quatro amostras para avaliação em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os corpos-de-prova foram inoculados com *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, incubados a 37°C por 72 horas, desinfetados por spray ou imersão de dióxido de cloro por 3 minutos. Cada corpo-de-prova foi colocado em tubo de ensaio contendo Tryptic Soy Broth (TSB) e, a

seguir, diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} foram semeadas em meios seletivos: Mannitol Salt Agar para *S. aureus*; MacConkey Agar para *E. coli* e Tryptic soy com 5 µg/ml de gentamicina para *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as colônias foram contadas. A segunda fase do trabalho avaliou o tempo de exposição ao spray desinfetante. Foram confeccionados 48 corpos-de-prova, divididos em 4 grupos, sendo 3 corpos-de-prova de cada reembasador submetido ao desinfetante testado por 1, 3 ou 10 minutos. De acordo com os resultados, o dióxido de cloro para as técnicas de spray e a imersão por 3 minutos não foi efetivo para promover desinfecção dos materiais reembasadores avaliados. O aumento no tempo de desinfecção em até 10 minutos não foi efetivo na redução do número de microrganismos viáveis. Considerando que, mesmo após a desinfecção, houve a presença de elevado número de microrganismos viáveis nos materiais reembasadores avaliados, os autores sugeriram, para um efetivo controle de contaminação cruzada, a remoção desses materiais das bases das próteses antes de seu envio ao laboratório.

Radford et al.⁵⁹, em 1998, compararam a capacidade de aderência da *C. albicans* (com e sem alterações fenotípicas) às superfícies de uma resina acrílica termopolimerizável (Trevalon) e dois materiais reembasadores (Molloplast B e Novus) com diferentes rugosidades superficiais. Para cada material, foram confeccionados 30 corpos-de-prova unidos dois a dois e uma das hemi-partes de cada um foi polimerizada contra duas lâminas de vidro e não receberam acabamento (controle). A outra hemi-parte dos corpos-de-prova da resina termopolimerizável e dos reembasadores recebeu acabamento com fresa de aço e com lixas de carbeto de silício, respectivamente. As colônias com e sem alteração de morfologia foram obtidas a partir de colônia padrão de *C. albicans* e incubadas por 18 a 20 horas em caldo nutriente. Em seguida, uma suspensão celular (10^7 org/ml) foi incubada durante uma hora em placas

de orifícios com as amostras avaliadas. Após a remoção das placas, os corpos-de-prova foram secos, montados em lâminas de vidro e corados. As leveduras e hifas aderidas foram contadas microscopicamente pela técnica de amostra estratificada. Para as leveduras, os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na adesão dos dois tipos de *C. albicans*. Além disso, foi observado que esses tipos morfológicos apresentaram maior aderência nas superfícies com acabamento e também para os materiais reembasadores em relação à resina termopolimerizável. Para as hifas, foi observado maior aderência de *C. albicans* com alteração fenotípica, mas não houve diferença significativa entre os diferentes materiais. Os autores concluíram que, para os materiais reembasadores, foi verificada uma maior aderência às superfícies rugosas em relação às superfícies lisas.

Webb et al.⁷⁹, em 1998, avaliaram a efetividade das microondas e do hipoclorito de sódio na desinfecção de próteses. Próteses totais superiores foram confeccionadas em resina acrílica e esterilizadas em autoclave. Dez próteses inoculadas com *C. albicans* e outras dez com *S. gordonii* foram incubadas a 37°C. Após a incubação, cinco das dez próteses de cada microrganismo foram utilizadas como controle (não irradiadas) e imersas em solução salina. As outras cinco próteses foram irradiadas a 350 W ou 604 W por 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos e então submetidas à cultura em placas de Petri. Seguindo os mesmos procedimentos descritos, dez próteses foram inoculadas com *C. albicans* e dez com *S. gordonii* e incubadas em banho de ultra-som por 48 horas a 37°C. A seguir cinco próteses foram imersas por 8 horas em solução de hipoclorito de sódio a 0,02% ou a 0,0125%. As outras cinco foram selecionadas como controle, sendo imersas em solução salina. Todas as próteses foram submetidas à cultura em placas de Petri. Algumas amostras em resina acrílica de cada condição foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados

evidenciaram que a irradiação em microondas a 604 W a partir de 2 minutos e a 350 W a partir de 6 minutos foi efetiva para eliminar o crescimento de *C. albicans* e *S. gordonii*, apesar desse procedimento não remover os microrganismos não-viáveis das superfícies das próteses, conforme observado nas fotomicrografias. Segundo os autores, o grau de sobrevivência dos microrganismos diminuiu com o aumento do tempo de exposição às microondas. Além disso, a imersão das próteses por 8 horas em hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,02 e 0,0125% eliminou o crescimento de *C. albicans* e reduziu o crescimento de *S. gordonii* pela remoção dos microrganismos da superfície das amostras, como observado nas análises em MEV. Dessa forma, os autores indicaram que a irradiação em microondas por 6 minutos poderia ser mais efetiva para a esterilização de próteses do que a imersão em hipoclorito de sódio, apesar de nenhum procedimento efetivamente eliminar todos os microrganismos das superfícies das próteses.

Border e Rice-Spearman¹², em 1999, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de materiais laboratoriais (meios de cultura, gases e *swabs*). Quatro bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*) e um fungo (*C. albicans*) foram inoculados individualmente em cinco tubos de ensaio contendo meio de cultura Trypticase Soy Broth (TSB) e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, 25 mL de cada solução foram irradiados a 650 W por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido nos tempos de 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 segundos de exposição às microondas. Os meios de cultura irradiados foram semeados em placas de Petri e incubados por 24 horas a 37°C. Gases e *swabs* estéreis foram imersos separadamente no meio de cultura TSB inoculado, irradiados por 15 segundos a 650 W e novamente irradiados por 30, 45, 60, 75, 90 e 120 segundos. Após as irradiações, as gases e os *swabs* foram semeados por esfregaço em placas de Petri e incubados a 37°C por 24 horas. As colônias foram quantificadas em

números por quadrante. Além disso, um frasco contendo TSB não inoculado foi irradiado em intervalos de um minuto até um total de 5 minutos de irradiação e semeados em placas de Petri a cada intervalo. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados demonstraram que foram necessários 60 segundos de irradiação para a esterilização de todos os microrganismos presentes no meio de cultura, nas gazes e nos chumaços de algodão. Além disso, os autores verificaram que, para esterilizar o meio de cultura não inoculado, foram necessários 3 minutos de irradiação.

Em 1999, Dixon et al.²⁵ avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de resinas acrílicas contaminadas com *C. albicans* e seu efeito sobre a dureza desses materiais. Na fase 1 do experimento, foram confeccionados 45 corpos-de-prova (10 mm x 10 mm x 3 mm) de cada material, sendo três rembasadores resilientes (Molloplast-B, Permaflex e/ou Permasoft) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199). Os corpos-de-prova foram submetidos aos ensaios de dureza (durômetro Shore A) e então inoculados com *C. albicans*. Após 48 horas, 30 corpos-de-prova foram irradiados a seco por 5 minutos em potência máxima, e o crescimento microbiológico foi avaliado por semeadura em placas de Petri. A esterilização a longo prazo (duas semanas) foi observada pela análise de crescimento visível no meio de tioglicolato contendo os corpos-de-prova desinfetados imersos nesse meio. Após 2 semanas, as leituras de dureza foram realizadas novamente para todos os corpos-de-prova. Para a fase 2, 15 corpos-de-prova de cada material foram irradiados a seco pelos tempos de exposição de 10 ou 15 minutos e submetidos aos ensaios de dureza. Amostras (n = 15 de cada material) imersas em 8 oz de água também foram irradiadas por 5 minutos. Na fase 3, 15 corpos-de-prova de cada material foram imersos em água e irradiados por 5 minutos em potência máxima. Para avaliar o efeito desse procedimento sobre a

dureza, os corpos-de-prova foram irradiados por 5 vezes. De acordo com os resultados, a irradiação a seco por 5 minutos não esterilizou nenhum dos materiais avaliados. Além disso, os corpos-de-prova não imersos e irradiados por 10 e 15 minutos não foram eficientemente esterilizados para todos os materiais avaliados. Entretanto, uma esterilização efetiva foi observada somente após a irradiação em microondas por 5 minutos quando os corpos-de-prova foram imersos em água. Os corpos-de-prova de todos os materiais não imersos e irradiados por 15 minutos e os corpos-de-prova imersos em água e irradiados por 5 minutos não resultaram em alteração de dureza clinicamente significativa. As 5 irradiações consecutivas de um mesmo corpo-de-prova resultou em uma alteração significativa na dureza do material PermaSoft. Com base nos resultados, os autores concluíram que 5 minutos de irradiação, foram suficientes para eliminar *C. albicans* desde que os materiais testados estivessem imersos em água durante o procedimento de irradiação.

Tendo em vista que o uso sucessivo de uma mesma esponja pode transferir bactérias de uma superfície a outra durante um procedimento de assepsia, Ikawa e Rossen³⁷, em 1999, avaliaram vários métodos para desinfecção de rotina em esponjas. Para simular utilização doméstica, algumas esponjas, previamente ao tratamento, foram lavadas manualmente em solução de composto quaternário de amônio e cloreto de magnésio, secas ao ar ambiente e embaladas. Outras esponjas foram inoculadas com microrganismos patogênicos com o objetivo de simular condições de uso em laboratório. Essas esponjas foram individualmente umedecidas com 54 mL de água destilada estéril e contaminadas com 4 mL de uma suspensão bacteriana de *E. coli*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. putrefaciens*. As esponjas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Os tratamentos químicos selecionados, para cada condição simulada, constituíram-se de imersão por 5 minutos, em uma das seguintes soluções: hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio,

álcool isopropil, quaternário de amônio, vinagre e amônia. Os tratamentos físico-químicos avaliados foram: escovação com detergente à base de composto quaternário de amônia ou alvejante e secagem associada ou não a um ciclo de alta temperatura a seco. Além disso, foi utilizada a imersão em água fervente por 5 minutos ou irradiação em microondas por um minuto em alta potência (tratamentos físicos). Os autores enfatizaram que as esponjas foram umedecidas antes da irradiação para prevenir que as esponjas, em estado seco, entrassem em combustão. Após cada tratamento, 1 mL da solução remanescente das esponjas foi inoculado em tubos de ensaio contendo Tryptic Soy Broth, que foram incubados a 35°C por 48 horas. Após esse período, os tubos de ensaio que apresentaram crescimento foram semeados em placas de Petri. Os tratamentos químicos avaliados foram efetivos na redução dos microrganismos presentes nas esponjas em que a utilização doméstica foi simulada, mas esses produtos não reduziram de forma significativa as bactérias presentes nas esponjas em que a utilização laboratorial foi simulada. Além disso, foi verificado que, para as duas condições de uso simuladas, a limpeza com detergente alvejante ou à base de composto quaternário de amônio, a imersão em água em ebulição por 5 minutos ou irradiação por microondas em alta potência durante 1 minuto reduziram a viabilidade dos microrganismos em 99,9%.

Lin et al.⁴⁶, em 1999, avaliaram a efetividade da solução de dióxido de cloro na desinfecção de próteses dentárias. Foram confeccionados 92 corpos-de-prova (6 mm x 6 mm x 75 mm) de resina acrílica termopolimerizável (Ch Lucitone), sendo 88 esterilizados em óxido de etileno e expostos às suspensões microbianas e 4 utilizados como controle negativo, esterilizados por autoclave e não expostos às suspensões microbiana. Os 88 corpos-de-prova foram colocados em Erlenmeyer contendo 400 mL de meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) com os seguintes microrganismos em concentração inicial de 10^7 org/mL:

E. coli, *S. aureus* e *C. albicans*. O Erlenmeyer contendo os corpos-de-prova inoculados foi submetido a termociclagem por 21 dias e, a seguir, metade das amostras (n = 44) foi desinfetada e a outra metade (n = 44) permaneceu não desinfetada (controle positivo). A desinfecção das amostras foi realizada por meio de spray de solução de dióxido de cloro (Alcide LD disinfectant). As amostras desinfetadas foram deixadas em descanso por 3 minutos e então enxaguadas em salina. A seguir, 46 amostras, sendo 22 não desinfetadas, 22 desinfetadas e 2 do grupo controle negativo, foram fraturadas em 4 partes. As outras 46 amostras foram mantidas intactas. Algumas amostras de cada grupo foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV), e a análise foi realizada tanto na superfície interna quanto na externa. As amostras não submetidas a MEV foram colocadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de TSB, agitadas por um minuto e deixadas em descanso por 9 minutos. Após esse período, as soluções dos tubos foram levemente agitadas e então submetidas às diluições seriadas em solução salina. Uma alíquota de 0,1 mL das diluições de 10^{-3} a 10^{-5} foi semeada em placas contendo um dos meios de cultura específicos para cada microrganismo testado: MacConkey Agar (*E. coli*), Mannitol Salt Agar (*S. aureus*) e Tryptic Soy Agar com 5 g/ml de gentamicina (*C. albicans*). Todas as placas foram incubadas a 37°C por 7 dias. Os meios de cultura dos tubos de ensaio contendo as amostras foram avaliados quanto à presença de crescimento nos períodos de 24 horas, 48 horas e 7 dias, e as placas foram analisadas quanto à presença de colônias viáveis. Todas as amostras do grupo controle negativo não apresentaram crescimento aparente nos tubos de ensaio. As amostras não desinfetadas (controle positivo), fraturadas ou não, produziram crescimento microbiano. O soma das colônias para *E. coli* foi maior que a soma para *S. aureus* e *C. albicans*. A MEV dos corpos-de-prova do controle positivo revelou maior quantidade de microrganismos nas superfícies externas comparadas às internas. Imediatamente após a desinfecção, para as amostras intactas ou

fraturadas, foi observada a presença de um número significativamente menor de colônias viáveis, em comparação ao grupo controle positivo. Entretanto, após 7 dias, as amostras desinfetadas exibiram crescimento aparente nos tubos de ensaio. A MEV das amostras desinfetadas exibiu microrganismos nas superfícies interna e externa, à exceção da presença de *C. albicans*, que não foi verificada no interior das amostras. Os autores concluíram que os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* penetraram no interior da resina acrílica e que a desinfecção por três minutos com Alcide LD foi eficaz para reduzir os microrganismos, mas não para eliminar completamente os mesmos.

Em 1999, Shim e Watts⁷⁰, avaliaram o efeito de um ciclo adicional de polimerização sobre a concentração de monômero residual de duas resinas acrílicas para base de prótese (Lucitone 199 e Trevalon). Os corpos-de-prova (50 mm x 3 mm) foram polimerizados pelo ciclo de polimerização curto (90 minutos a 73°C seguido de 30 minutos a 100°C) ou longo (9 horas a 73°C). Após 24 horas da polimerização, metade dos corpos-de-prova foi submetida a um ciclo de polimerização adicional em água a 100°C por 2 horas. Este ciclo, sugerido pelo fabricante de uma resina reembasadora resiliente (Molloplast B), foi realizado com objetivo de avaliar o efeito desse tratamento empregado no reembasamento de próteses sobre a concentração de monômero residual das resinas testadas. Os demais corpos-de-prova não foram submetidos ao ciclo de polimerização adicional, sendo utilizados como controle. Foram confeccionados 6 corpos-de-prova para cada condição avaliada. De acordo com os resultados, o ciclo adicional em água a 100°C por 2 horas promoveu uma redução significativa na concentração de monômero residual nas duas resinas avaliadas. Além disso, a concentração de monômero residual mais elevada foi observada quando o ciclo longo foi utilizado sem a aplicação do ciclo de polimerização adicional.

O mecanismo de transferência transitória de calor de uma suspensão de *S. aureus* após a irradiação em microondas foi avaliado por Yeo et al.⁸², em 1999. Culturas bacterianas de *S. aureus* foram inoculadas em meio nutriente, incubadas a 37°C por 8 horas e centrifugadas por 10 minutos. Para a exposição às microondas, foram utilizadas suspensões bacterianas em meio de cultura e em água destilada estéril. Adesivos indicadores de temperatura foram aplicados em discos estéreis de aço inoxidável (15 x 5 mm). As suspensões bacterianas em meio de cultura ou em água destilada foram pipetadas sobre as superfícies dos discos. Em seguida, os discos foram irradiados a 800 W em vários tempos de exposição. As potências absorvidas pelos discos de aço inoxidável e pelas suspensões bacterianas foram calculadas por uma equação de condução térmica. A análise de transferência de calor entre os microrganismos e a água destilada foi avaliada por um método específico capaz de calcular o nível tempo-dependente de absorção de energia do microrganismo e do líquido circundante ao mesmo. Os resultados evidenciaram que a viabilidade celular foi reduzida com o aumento do tempo de exposição, havendo uma inativação completa da suspensão bacteriana após 110 segundos, quando a temperatura atingiu o valor de 61,4°C. O baixo índice de aumento de temperatura da suspensão bacteriana quando comparada com água destilada estéril ou meio de cultura testados sem inóculo foi atribuído pelos autores a uma significativa influência da eficácia de esterilização pelas microondas nas propriedades térmicas dos microrganismos. Os autores concluíram que, quando o inóculo bacteriano sobre o disco de aço inoxidável foi submetido às microondas, a condução de calor do disco de aço para o inóculo foi a causa do efeito bacteriostático, com absorção de 23,8 W de potência pelo aço e de 0,16 W pela suspensão bacteriana. Dessa forma, os autores sugeriram que a ação de eliminação de *S. aureus* em discos de aço inoxidável foi principalmente atribuída à transferência de calor do

substrato de aço, com pouca energia absorvida diretamente da irradiação por microondas.

Liatsikos et al.⁴⁵, em 2000, avaliaram, por meio de uma revisão da literatura, a utilização das microondas no tratamento da prostatite. Os primeiros estudos utilizavam as microondas para promover uma hipertemia na próstata com um aquecimento de 42°C para 44°C. A terapia por microondas evoluiu e passou a ser aplicada por um dispositivo transuretral sob um tratamento denominado termoterapia transuretral por microondas (TUMT). Essa terapia utiliza energia térmica gerada pelas microondas para produzir mudanças celulares irreversíveis no tecido da próstata sem que haja alterações significativas na uretra. A interação das microondas com os tecidos resulta em geração de calor por meio da oscilação de cargas livres no campo eletromagnético e da polarização de pequenas moléculas. A energia cinética molecular resultante aumenta a temperatura tecidual (45°C por 30 minutos) causando a morte celular. Além disso, segundo os autores, as microondas também possuem um efeito não térmico resultante da interação do campo eletromagnético com as moléculas dos microrganismos. Foi também relatado que a TUMT pode ser uma terapia benéfica e efetiva a longo prazo, tanto nos casos de prostatite não bacteriana ou bacteriana. Foi observada uma redução significativa no número de colônias de microrganismos causadores da prostatite bacteriana (*E. coli* e *E. cloacae*). Com base nos dados encontrados na literatura, os autores concluíram que não somente o calor gerado pelas microondas, mas também o efeito das ondas eletromagnéticas são responsáveis pelas alterações causadas nos microrganismos.

Watanabe et al.⁷⁷, em 2000, investigaram o efeito dos componentes iônicos na inativação de microrganismos pela irradiação em microondas. As suspensões microbianas utilizadas (*E. coli*, *S. aureus* e *C.*

albicans) apresentaram uma concentração inicial de 2×10^7 ufc/mL. Periodicamente, concentrações de NaCl, KCl e sacarose foram adicionadas às suspensões resultantes. Tubos de ensaio com a suspensão resultante foram colocados individualmente em Erlenmeyer contendo água e mantidos a 30°C por 5 minutos. A seguir, cada Erlenmeyer foi irradiado a 500 W por vários tempos experimentais e amostras da solução irradiada foram utilizadas para a contagem dos microrganismos viáveis. A temperatura das suspensões microbianas foi determinada com o auxílio de um termômetro digital. Os resultados evidenciaram que os microrganismos avaliados foram inativados após 50 segundos de irradiação. A temperatura das suspensões microbiológicas aumentou de 30°C para 100°C após 30 segundos de irradiação a 500 W. Quando a temperatura inicial foi mantida a 0,5°C, a temperatura das suspensões aumentou para 28°C após 30 segundos de irradiação e, nessas condições, as células de *E. coli* não foram inativadas. De acordo com os resultados, os autores sugeriram que o efeito das microondas sobre os microrganismos foi principalmente devido ao calor gerado nas suspensões das células microbianas. Além disso, foi observado que as células microbianas foram inativadas com o aumento das concentrações de NaCl e KCl. Por outro lado, variando-se as concentrações de sacarose, houve mínima alteração de temperatura e a inativação das células microbianas foi pouco afetada. Para explicar esses resultados, os autores avaliaram o efeito das condições utilizadas no frasco de Erlenmeyer no aumento da temperatura do líquido contido nos tubos de ensaio colocados no frasco. Para este procedimento, os autores colocaram os tubos de ensaio com líquido (água ou solução de NaCl) em Erlenmeyers vazios ou cheios de líquido (água ou solução de NaCl). Foi verificado que o líquido no interior do tubo de ensaio aqueceu mais rapidamente quando o Erlenmeyer estava vazio. Essa observação foi atribuída ao fato da energia de microondas ter penetrado diretamente no líquido do tubo de ensaio, uma vez que não havia líquido no Erlenmeyer. No entanto,

quando o Erlenmeyer estava com a solução de NaCl, o líquido no interior dos tubos de ensaio aqueceu muito menos que a solução do frasco. Os autores concluíram que, quando o volume da solução irradiada é menor ou quando a área superficial exposta às microondas é ampla, há maior possibilidade da irradiação por microondas aquecer todo o líquido contendo substâncias com alta perda dielétrica.

Banting e Hill⁸, em 2001, realizaram um estudo para comparar a efetividade da energia de microondas como tratamento coadjuvante de candidose bucal. Trinta e quatro pacientes portadores de próteses totais superiores com teste positivo para pseudohifas de *C. albicans* foram selecionados para um dos seguintes tratamentos: irradiação da prótese em microondas ou imersão da prótese em solução de clorexidina a 0,2% (controle). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina 300000 IU 3 vezes ao dia) por 14 dias. As próteses selecionadas para o tratamento com as microondas foram escovadas com sabão anti-séptico e água e então irradiadas por um minuto a 850 W em três dias diferentes (1, 5 e 10^o dia). Para o grupo controle, as próteses foram imersas na solução de clorexidina durante a noite por 14 dias, com renovação da solução a cada dois dias. Essas próteses também foram escovadas em 3 dias diferentes (1, 5 e 10^o dias) estabelecendo parâmetro para comparação entre os grupos. Os resultados demonstraram que, após 14 dias, 53% das próteses submetidas ao tratamento com microondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem aumentou para 84% para as próteses submetidas à imersão em clorexidina. Por outro lado, após esse mesmo período, as camadas citológicas referentes à mucosa palatina dos pacientes cujas próteses foram irradiadas apresentaram um quarto do risco de infecção dos tecidos palatinos em relação aos pacientes que tiveram suas próteses imersas em clorexidina. Três meses após o tratamento, o grupo controle foi considerado cinco vezes mais susceptível

a apresentar pseudohifas de *C. albicans* quando em comparação com o grupo que recebeu tratamento com as microondas. Os autores observaram que a exposição das próteses às microondas foi efetiva para uma adequada desinfecção nas próteses sem ocasionar efeitos deletérios aparentes no material das mesmas.

Hiti et al.³⁴, em 2001, avaliaram o efeito da irradiação por microondas na desinfecção de recipientes para armazenamento de lentes de contato contaminados com *Acanthamoeba*. Recipientes para armazenamento de lentes de contato foram contaminados (10^6 org/mL) com três diferentes espécies de *Acanthamoeba* (*A. comandoni*, *A. castellanii*, *A. hatchetti*), nas formas de trofozoítos e cistos. Foi também avaliado o efeito das microondas sobre cistos de *Acanthamoeba* completamente desidratados. A irradiação por microondas para cada recipiente foi realizada a 600 W por 3, 5 ou 8 minutos. Em seguida, esfregaços da parte interna dos recipientes foram semeados em placas de Petri incubadas a 30°C por 14 dias. Os autores observaram que a irradiação por microondas foi efetiva na esterilização dos recipientes contaminados com três espécies de *Acanthamoeba* após 3 minutos de exposição a 600 W. Além disso, a desidratação dos cistos de *Acanthamoeba* reduziu sua susceptibilidade às microondas, uma vez que houve crescimento independentemente do tempo de exposição utilizado. Os autores enfatizaram que os materiais contendo água são aquecidos pela vibração molecular e, como a célula biológica é caracterizada por um alto conteúdo de água, os microrganismos se tornam sensíveis à irradiação por microondas. Dessa forma, a célula desidratada não apresenta essa vibração molecular e, por isso, a efetividade das microondas, nessas condições, é significativamente reduzida.

As propriedades relacionadas às superfícies dos materiais utilizados para a confecção de próteses são importantes do ponto de vista

clínico, uma vez que podem interferir com o acúmulo de placa e manchamento. Dentre essas características podem ser citadas rugosidade, hidrofobicidade, interações eletrostáticas, tensão superficial, energia livre de superfície, umidade e dureza superficial. Em particular, a rugosidade provoca aderência e retenção de *C. albicans* e pode estar relacionada à etiologia de estomatite protética. Considerando esses aspectos, Zissis et al.⁸⁴, em 2001, avaliaram a rugosidade de resinas para base de prótese e resinas reembasadoras. Para a confecção dos corpos-de-prova, foram selecionadas quatro resinas para base de prótese (Microbase, Trevalon, MC Acron, SR 3/60 Plus), nove resinas reembasadoras rígidas (Light Liner Hard, Triad Reline, Lighton-U, Triad DualLine, Rebaron LC, Astron LC, Rebaron, Probase Cold, SR3/60 Triplex) e sete resinas reembasadoras resilientes (Perform Soft, Light Liner Soft, Resiline, Astron LC, Mollosil, Mollosil + varnish, Molloplast B, Molloplast B+ varnish, Permaflex, Permaflex + varnish). Cinco corpos-de-prova de cada material foram obtidos a partir de moldes incluídos em mufla. Após a confecção, os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada a 37° C por um mês antes dos testes. As leituras de rugosidade foram obtidas por mapeamento (scanning) realizado com um estilete de diamante sob carga constante, posicionado sobre a superfície do material avaliado. Cinco leituras de rugosidade foram realizadas em cada corpo-de-prova. O valor médio de rugosidade (R_a) de cada amostra foi obtido pelo cálculo da média aritmética das leituras obtidas. Os resultados evidenciaram que os valores de R_a obtidos para os materiais avaliados variaram de 3,4 a 7,6 micrômetros. Os materiais para base de prova apresentaram valores de R_a entre 3,4 micrômetros e 1,6 micrômetros, enquanto os materiais reembasadores rígidos exibiram valores de R_a entre 0,7 a 4,4 micrômetros. Os valores de R_a para as resinas reembasadoras resilientes auto e fotopolimerizáveis variaram entre 0,7 a 3,5 micrômetros e os mesmos valores obtidos com as resinas reembasadoras resilientes termopolimerizáveis variaram entre 3,5 a 4,0

micrômetros. Como os valores de rugosidade obtidos com todos os materiais avaliados foram superiores a 0,7 micrômetros, os autores concluíram que há possibilidade de acúmulo de placa, uma vez que 0,2 micrômetros é considerado o limiar abaixo do qual a aderência de fungos e bactérias não é possível.

Goodson et al.³⁰, em 2003, avaliaram a efetividade de um agente para limpeza de próteses totais disponível comercialmente, associado à irradiação de microondas, na desinfecção de próteses totais. Os autores utilizaram 20 próteses que haviam sido utilizadas por 12 a 48 anos. As próteses inferiores foram utilizadas íntegras. As próteses superiores foram seccionadas na sua região mediana, e os fragmentos assim obtidos foram avaliados quanto à sua contaminação inicial. As regiões correspondentes às superfícies externa e interna e às áreas de fratura dos fragmentos foram cultivados em 3 diferentes meios de cultura específicos para leveduras, para microrganismos facultativos/anaeróbios e para microrganismos que exigem nutrientes especiais. A seguir, parte das amostras foi submetida imediatamente aos seguintes procedimentos de limpeza: A - imersão em um agente de limpeza experimental e irradiação em microondas por 2 minutos; B – imersão no agente de limpeza Polident, disponível comercialmente; C – imersão em água de torneira por 5 minutos. O restante dos fragmentos foi armazenado a -80°C durante 6 meses. Após o descongelamento, os fragmentos foram imersos assepticamente em solução de Polident e irradiados durante 2 minutos (sistema B¹). Os procedimentos de limpeza foram realizados 3 vezes, e, após cada tratamento, todos os fragmentos foram cultivados da mesma maneira como foi realizado antes de serem submetidos aos procedimentos de limpeza. Foram determinadas as unidades formadoras de colônia antes e após de cada um dos tratamentos avaliados. Foi verificado que a irradiação em microondas melhorou significativamente a eficácia do Polident na redução do número de microrganismos viáveis das

próteses. Os autores sugeriram que a utilização diária do sistema B¹ de limpeza de próteses poderia prevenir a reinfecção dos pacientes por meio das próteses contaminadas com os microrganismos causadores de candidose bucal.

Neppelenbroek et al.⁵¹, em 2003, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de resinas rígidas para reembasamento imediato. Corpos-de-prova (10 x 10 x 1 mm) de três resinas reembasadoras rígidas (Kooliner, Tokuso Rebase and Ufi Gel hard) foram confeccionados e esterilizados por meio de óxido de etileno. Os corpos-de-prova foram então individualmente inoculados (10^7 cfu/mL) com meio de cultura de Tryptic Soy Broth (TSB) contendo um dos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Após 48 h de incubação a 37°C, os corpos-de-prova foram agitados por 1 minuto e deixados em repouso por 9 minutos, seguido de nova agitação para suspender qualquer microrganismo aderente. Após a inoculação, 40 corpos-de-prova de cada material foram imersos em 200 mL de água e irradiados a 650 W por 6 minutos. Quarenta corpos-de-prova não irradiados foram utilizados como controle positivo. A seguir, 25 µL da suspensão resultante das diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} foram semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura seletivo para cada microrganismo. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após a incubação, as colônias foram quantificadas em ufc/mL. Os corpos-de-prova irradiados foram imersos em meio de cultura e incubados a 37°C por 7 dias. Vinte corpos-de-prova foram preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todos os corpos-de-prova demonstraram efetiva esterilização após a irradiação em microondas. A análise em MEV indicou alteração na morfologia celular dos microrganismos após irradiação em microondas. Os corpos-de-prova irradiados e incubados por 7 dias não demonstram crescimento microbiológico visível no meio de

cultura. A esterilização por microondas por 6 minutos a 650 W provou ser um método efetivo para a esterilização de resinas reembasadoras rígidas.

Ribeiro, em 2004⁶⁰, avaliou o efeito da irradiação por microondas sobre as propriedades mecânicas de resistência à flexão e dureza de resinas acrílicas (Kooliner, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C, New Truliner e Lucitone 550). Para a irradiação, cada corpo-de-prova foi individualmente imerso em 200 mL de água destilada e submetido a dois ciclos de irradiação a uma potência constante de 650 W, variando-se o tempo de exposição (0 a 5 minutos). Os resultados demonstraram que para a resina Kooliner a elevação no tempo de exposição às microondas promoveu aumento na resistência à flexão em todos os tempos avaliados, porém esse aumento foi significativo somente após 5 minutos de irradiação, em comparação ao controle. A resistência à flexão dos materiais Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C, New Truliner e Lucitone 550 não foi alterada pelos tempos de desinfecção testados. Foi demonstrado que a dureza Vickers da resina Kooliner aumentou significativamente após 3, 4 e 5 minutos de irradiação em relação ao controle. Para a resina Ufi Gel Hard C, o aumento significativo em relação ao controle ocorreu em 4 e 5 minutos. Já para New Truliner, apenas a média de dureza após 5 minutos de irradiação foi significativamente maior que o controle. Os valores de dureza da resina para base de prótese Lucitone 550 não foram significativamente alterados pelos tempos de desinfecção avaliados, quando comparados ao controle. Dessa forma, foi verificado que a desinfecção em microondas não ocasionou efeitos deletérios na resistência à flexão e dureza dos materiais avaliados, independente do tempo de irradiação utilizado.

O objetivo do estudo de Silva et al.⁷¹, em 2004, foi avaliar a efetividade das microondas na inativação da *C. albicans* (fungo) em próteses totais. Para isso, 20 próteses padronizadas foram

confeccionadas e submetidas à esterilização com óxido de etileno. A seguir, as próteses foram individualmente contaminadas com *C. albicans* e incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse período, os béqueres foram divididos em dois grupos. A primeira metade foi submetida a diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} e semeadas em placas de Petri, com meio de cultura específico para o microrganismo. A outra metade foi submetida à desinfecção em microondas, de acordo com o procedimento sugerido por Neppelenbroek et al.⁵¹, em 2003, e, posteriormente, foi plaqueada, como descrito para as próteses não irradiadas. A contagem das ufc, após 48 horas de incubação, foi realizada, e os autores verificaram que não houve contagem de colônias nas placas referentes ao grupo de próteses irradiadas. Os autores concluíram que o procedimento de desinfecção sugerido por Neppelenbroek et al.⁵¹ foi efetivo na esterilização de próteses totais contaminadas com *C. albicans*.

O objetivo do estudo de Campanha¹⁵, em 2005, foi investigar os efeitos das microondas sobre células de *Candida albicans*, por meio de parâmetros de contagem celular e de liberação de substâncias intracelulares. Para a realização dos experimentos, foram obtidas culturas de *C. albicans* de 24 h em Tryptic Soy Broth (TSB). As células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 400 mL de água destilada gelada na concentração de 10^8 cél/mL. Essa suspensão foi dividida em experimental e controle. A suspensão experimental foi colocada em um béquer contendo uma prótese total acrílica estéril e irradiada por microondas durante 6 minutos a 650 W. A suspensão controle não foi submetida à irradiação. Para ambas as suspensões, foram realizadas diluições seriadas para contagem celular em câmara de Neubauer e semeadura em agar Sabouraud dextrose (ASD), ou foi mensurada a densidade óptica (DO) a 550 nm de alíquotas, não diluídas, de 5 mL das suspensões. Para a quantificação de substâncias liberadas, as células foram eliminadas das suspensões por centrifugação e filtragem,

e, a solução resultante foi liofilizada para eliminação da água. O conteúdo liofilizado foi ressuspenso em 5 mL de água destilada e analisado pelos seguintes métodos: Microprote e Sensiprote, para análise de proteínas; potenciometria, para análise de Na⁺ e K⁺; Liquiform, para análise de Ca⁺⁺; e DO a 260 nm para análise de ácidos nucléicos. Todos os testes foram realizados em duplicata e repetidos em 8 dias diferentes. Não houve diferença entre as suspensões experimental e controle, quando foram comparadas suas médias de DO a 550 nm e de contagem do número total de células em câmara de Neubauer. As células da suspensão controle apresentaram integridade, enquanto que as da suspensão experimental não apresentaram integridade de membrana. Não foram encontradas ufc contáveis nas placas de ASD da suspensão experimental, enquanto que a suspensão controle apresentou contagens da ordem de 10⁸ ufc/mL. A liberação de proteínas da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle, tanto pelo sistema Microprote, quanto para o sistema Sensiprote. A liberação de K⁺, Ca⁺⁺ e ácidos nucléicos da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle, enquanto que não foi detectada a presença de Na⁺ em nenhuma das suspensões. A autora concluiu que o procedimento de desinfecção de próteses avaliado alterou a permeabilidade de membrana e a capacidade de crescimento dos microrganismos, sem, no entanto, provocar lise completa das células de *C. albicans* em suspensão.

3 Proposição

Com base nas informações apresentadas nos capítulos anteriores, este estudo teve como objetivo avaliar a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de uma resina acrílica autopolimerizável utilizada para reembasamento imediato, em função de:

- ✓ cinco tempos de exposição às microondas;
- ✓ quatro espécies de microrganismos patogênicos.

4 *Material e Método*

Para a realização da fase experimental dessa pesquisa foram utilizados os seguintes materiais, instrumentos e aparelhos:

4.1 *Material*

- 1- Resina acrílica autopolimerizável para reembasamento imediato Tokuso Rebase Fast, fabricada pela Tokuyama Corp., Tokyo, Japão
Lote nº U570612
- 2- Gás de óxido de etileno (mistura de 30% de óxido de etileno e 70% de gás carbônico), produzido pela Wait Martins Ltda., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil
- 3- Cultura de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 27853
- 4- Cultura de *Staphylococcus aureus* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 25923
- 5- Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 60193
- 6- Cultura de *Bacillus subtilis* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 6633
- 7- Lixa d'água marca Norton, granulação 600
- 8- Lâminas de acetato
- 9- Água destilada

-
- 10-Meio de cultura Muller Hinton Agar produzido pela Acumedia
Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Cod 7101A
Lote nº0010-126
- 11-Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), produzido pela Acumedia
Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Cod 7164A
Lote nº0008-120
- 12-Meio de cultura Mannitol Salt Agar, produzido pela Acumedia
Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Cod 7143A
Lote nº0007-101
- 13-Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, produzido pela
Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Cod 7150A
Lote nº0011-105
- 14-Meio de cultura Tryptic Soy Agar, produzido pela Acumedia
Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Cod 7100A
Lote nº0012-108
- 15-Sódio cloreto (P. A. A. C. S.), produzido por CAQ- Casa da química
Indústria e Comércio Limitada
- 16-Pontas descartáveis para micropipeta
- 17-Embalagens para esterilização em óxido de etileno, produzido por
ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria Limitada,
Campinas, São Paulo, Brasil

4.2 Instrumentos

- 1- Matriz metálica quadrada de aço inoxidável, com centro vazado com dimensões de 10 mm de largura por 1 mm de altura e sulco de escape
- 2- Placas de vidro quadradas com dimensões de 20 mm de largura por 2 mm de altura
- 3- Placas de Petri pyrex 100 X 15 mm, fabricada por Petriq
- 4- Tubos de ensaio pyrex nº9820
- 5- Pipetador de borracha
- 6- Pipeta de vidro de 2 mL, fabricada pela Vidrolabor
- 7- Béquer graduado, fabricado pela Vidrolabor
- 8- Erlenmeyer graduado, fabricado pela Vidrolabor
- 9- Micropipeta de 20-200 µL, fabricada pela Boeco, Alemanha
- 10- Micropipeta de 100-1000 µL, fabricada pela Boeco, Alemanha
- 11- Bico de Bunsen
- 12- Alça metálica para inoculação de microrganismos
- 13- Alça de Drigalsky, fabricada pela Vidrolabor

4.3 Aparelhos

- 1- Contador de colônias CP 600 Plus, fabricado pela Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo: CP-600
Nr-série: 919
- 2- Balança de precisão, fabricada por Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil
Modelo: BG 400
Nº 016450
- 3- Autoclave vertical, fabricada pela Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo : AV 60
Nº 6614
- 4- Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo: MA 033
Série: 9819
- 5- Agitador de tubos, fabricado por Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo: AP 56
Série: 9803
- 6- Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo – MA 0324
Série – 9819011
- 7- Câmara de fluxo laminar vertical, fabricada pela Pachane Indústria e Comércio Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo – PA 115
Número – 12898

- 8- Microondas de dupla emissão de ondas, produzido pela Brastemp, Manaus, Amazonas, Brasil
Modelo: Sensor Crisp 38 – DES (Double Emission System)
- 9- Polidora automática Politriz Metaserv 2000, produzida por Buehler, UK Limitada, Coventry, England
Modelo: 952829
- 10-Microscópio Eletrônico de Varredura:
Modelo: DSM 940 A, Zeiss, Germany
Tensão: 5,0 KV
Aumentos: 1000 x, 2500 x e 5000 x
- 11-Metalizador
Modelo: MED 010, Balzers
- 12-Dessecador, marca pyrex, Indústria Brasileira, SM
- 13-Câmara de autoclave para esterilização com óxido de etileno, fabricado pela LUTIS-Ferrando, Brasil
Modelo -1800L
Especificação - LUTIS Ferrando 1800

4.4 Método

Obtenção dos corpos-de-prova

Para a confecção dos corpos-de-prova, foram utilizadas matrizes metálicas quadradas com centro vazado apresentando 10 mm de largura e 1 mm de altura (Figura 1).



FIGURA 1: Matriz metálica de centro vazado

Inicialmente, para a obtenção de cada corpo-de-prova, uma lâmina de acetato (20 mm X 20 mm X 2 mm) foi colocada sobre uma placa de vidro (20 mm X 20 mm X 2 mm). Em seguida, cada matriz metálica foi posicionada sobre a lâmina de acetato, e o material reembasador foi proporcionado e manipulado segundo as recomendações do fabricante e vertido no centro da matriz metálica. Para cada corpo-de-prova, a resina Tokuso Rebase Fast foi dosada numa proporção de 2,052 g para 1 mL de líquido para cada corpo-de-prova do material. O pó da resina Tokuso Rebase Fast foi colocado no gral de borracha fornecido pelo fabricante e, a seguir, o líquido previamente dosado foi acrescentado ao pó. A manipulação do material foi realizada por um período de 5 a 10 segundos por meio de uma espátula de plástico fornecida pelo fabricante. Após a manipulação, a resina foi vertida no centro da matriz metálica, uma outra lâmina de acetato (20 mm X 20 mm X 2 mm) foi colocada sobre a resina reembasadora, e uma outra placa de vidro de mesmas

dimensões foi posicionada sobre todo o conjunto. Um peso de 50 g foi colocado sobre a última placa de vidro e mantido sobre a mesma durante 8 minutos até a polimerização final do material (Figura 2).



FIGURA 2: Peso posicionado sobre o corpo-de-prova

Concluída a polimerização, a placa de vidro e a lâmina de acetato posicionadas sobre a matriz metálica foram removidas. Em seguida, os corpos-de-prova foram cuidadosamente removidos das matrizes metálicas. Posteriormente, os excessos laterais verificados nos corpos-de-prova foram removidos com o auxílio de uma lixa de carbetto de silício (granulação 600) acoplada a uma politriz automática (Figura 3).



FIGURA 3: Corpo-de-prova

Foram confeccionados 286 corpos-de-prova da resina reembasadora Tokuso Rebase Fast.

Preparo dos materiais microbiológicos

O meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) foi preparado para a inoculação dos microrganismos e para a contaminação e a incubação dos corpos-de-prova. Esse meio de cultura constitui-se de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de microrganismos, incluindo os que foram testados neste estudo.

O meio de cultura (TSB) foi proporcionado, manipulado e esterilizado segundo as recomendações do fabricante. Para o preparo do meio, foi utilizada uma proporção de 30 g de pó do meio de cultura para 1 L de água destilada. O pó proporcionado foi colocado em um béquer, e a água dosada foi adicionada. A seguir, o béquer foi colocado em banho-maria até que fosse observada uma dissolução completa do meio de cultura na água destilada. Após a dissolução, a solução resultante foi distribuída em tubos de ensaio. Uma alíquota de 10 mL do meio de cultura preparado foi pipetada e dispensada em cada um dos tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram devidamente identificados e datados. A seguir, esses tubos contendo o meio de cultura foram tampados com algodão e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após esse procedimento, os tubos de ensaio tampados foram deixados ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

A solução salina utilizada nas diluições seriadas realizadas neste estudo foi preparada pela diluição completa de 8,5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada. A dissolução do sal na água destilada foi realizada em um béquer, pela manipulação de uma haste de vidro. Após a dissolução, a solução salina resultante, na concentração de 0,15 mol, foi distribuída em tubos de ensaio. Para a distribuição, 4,5 mL da solução salina foram pipetados e transferidos para cada um dos tubos de ensaio. A seguir, esses tubos foram tampados com algodão e levados

em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos de ensaio foram deixados ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, os tubos de ensaio contendo solução salina foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

Os meios de cultura utilizados nas sementeiras das placas de Petri são sólidos após o preparo, sendo não seletivos e seletivos para certas espécies de microrganismos. Os meios de cultura não seletivos selecionados para este estudo foram os seguintes: Muller Hinton Agar para *P. aeruginosa* e Tryptic Soy Agar para *B. subtilis*. Os meios de cultura seletivos selecionados foram: Mannitol Salt Agar para *S. aureus* e Sabouraud Dextrose Agar contendo 5 µg/mL de cloranfenicol para *C. albicans*. Esses meios de cultura foram proporcionados, manipulados e esterilizados segundo as recomendações dos fabricantes. Para o preparo dos meios de cultura, foram utilizadas as seguintes proporções: 38 g de pó de Miller Hinton Agar para 1 L de água destilada; 111 g de pó de Mannitol Salt Agar para 1 L de água destilada, 65 g de Sabouraud Dextrose Agar misturada a 0,005 g de cloranfenicol para 1 L de água destilada e 40 g de pó de Tryptic Soy Agar para 1 L de água destilada. Para o preparo, os meios de cultura proporcionados foram individualmente colocados em um béquer e misturados com a água destilada. A seguir, cada béquer foi levado ao banho-maria até que ocorresse a dissolução completa de cada meio de cultura. Uma alíquota de 20 mililitros da solução resultante foi pipetada e dispensada em tubos de ensaio, ainda na fase líquida (temperatura superior à temperatura de solidificação). A seguir, os tubos de ensaio foram devidamente identificados, datados, tampados com algodão e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os meios de cultura, ainda na fase líquida, foram vertidos em placas de Petri estéreis. Para a realização desse procedimento, os tubos de ensaio contendo os meios de cultura foram levados à câmara de fluxo laminar.

Para receber os tubos de ensaio, a câmara de fluxo laminar vertical foi preparada para permitir um ambiente asséptico para a manipulação dos tubos de ensaio e das placas de Petri. Para isso, a porta de vidro da câmara de fluxo laminar foi fechada e a luz ultravioleta foi acionada por 10 minutos. Após esse período, a luz ultravioleta foi desligada e o ventilador da câmara de fluxo laminar foi acionado para aclimatização do ambiente. A porta de vidro da câmara de fluxo laminar foi ligeiramente aberta para que os tubos de ensaio e as placas de Petri estéreis fossem colocados no ambiente asséptico criado. É importante ressaltar que a esterilização das placas de Petri foi realizada previamente aos procedimentos executados na câmara de fluxo laminar. Para a esterilização das placas de Petri, um papel filtro cortado em círculo foi interposto entre as partes superior e inferior de cada uma delas. A parte superior e a inferior das placas de Petri foram encaixadas e todo o conjunto foi embalado em papel comum. As placas embaladas foram esterilizadas em estufa a 175°C por 2 horas.

Após a esterilização, as placas de Petri embaladas foram deixadas ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Após esse procedimento, as placas de Petri foram levadas à câmara de fluxo laminar e retiradas das embalagens de papel comum. Após a colocação das placas de Petri e dos tubos de ensaio na câmara de fluxo laminar, foram repetidos os procedimentos previamente descritos para que a manipulação dos meios de cultura fosse realizada de forma asséptica. Após a aclimatização, o ventilador permaneceu ligado durante todo o procedimento de colocação dos meios de cultura nas placas. Os tubos de ensaio foram individualmente vertidos nas placas de Petri. Cada tubo de ensaio contendo 20 mL de um dos meios de cultura utilizados para cada microrganismo foi aberto e o conteúdo do mesmo foi vertido na parte inferior da placa de Petri. As placas de Petri foram individualmente fechadas e mantidas na câmara de fluxo laminar até que fosse observada a solidificação do meio de cultura. Após a solidificação dos meios de

cultura, o ventilador foi desligado, e a câmara de fluxo laminar foi aberta. Todas as placas de Petri foram devidamente identificadas, datadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Estes procedimentos foram realizados com o objetivo de verificar a esterilização das placas de Petri e dos meios de cultura. Após a incubação, foram descartadas deste estudo todas as placas que apresentaram quaisquer indícios de crescimento microbiano. A seguir, a parte inferior de cada placa de Petri foi externamente dividida em quadrantes. Esses quadrantes foram traçados com caneta para retroprojektor para facilitar posteriormente os procedimentos de semeadura dos microrganismos (diluição seriada por quadrante). Finalmente, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 5°C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura dos microrganismos.

Os béqueres utilizados para a desinfecção dos corpos-de-prova em microondas foram previamente autoclavados. Para este procedimento, 200 mL de água destilada foram medidos em proveta de 500 mL e transferidos para cada um dos béqueres. Estes béqueres foram tampados com papel alumínio e levados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos.

Esterilização dos corpos-de-prova

Logo após a confecção, todos os corpos-de-prova foram esterilizados por meio de óxido de etileno. Esse procedimento foi selecionado por ser considerado seguro para a esterilização dos materiais, uma vez que apresenta a vantagem de preservar as propriedades inerentes à resina acrílica⁴⁶. Para a realização desse procedimento, cada corpo-de-prova foi acondicionado em embalagem individual especial fornecida pela indústria responsável pela esterilização. Essas embalagens funcionam, quando lacradas, como uma barreira à passagem de microrganismos uma vez que são constituídas de papel

grau cirúrgico e filme plástico. Segundo a indústria responsável pela esterilização, o papel grau cirúrgico apresenta poros especiais que permitem a passagem do gás de óxido de etileno para esterilização dos corpos-de-prova quando colocadas na câmara de autoclave. O gás de óxido de etileno utilizado para a esterilização dos corpos-de-prova consiste de uma mistura de 30% de EtO (óxido de etileno) e 70% de CO₂ (gás carbônico). Para o ciclo de esterilização dos corpos-de-prova, foram utilizados 450 mmHg de vácuo, 1,0 Kg/cm² de pressão, aeração de 3 lavagens com nitrogênio líquido e umidade relativa de 50% a 55%. A temperatura utilizada no ciclo de esterilização foi de 40°C. Após 8 horas nessas condições, as embalagens lacradas contendo os corpos-de-prova foram retiradas da câmara de esterilização (Figura 4). É importante ressaltar que os corpos-de-prova permaneceram por um mínimo de 15 dias no interior das embalagens lacradas antes de serem utilizados. Segundo a indústria responsável pela esterilização, esse período é considerado suficiente para que haja a liberação do gás de óxido de etileno absorvido. Se o óxido de etileno não for completamente liberado, os resultados microbiológicos podem ser invalidados uma vez que, nessa fase, não há crescimento microbiano.



FIGURA 4: Corpo-de-prova esterilizado

Com o objetivo de avaliar a eficácia da esterilização com óxido de etileno, dois corpos-de-prova (controle negativo) do material reembasador avaliado foram colocados em meio de cultura e incubados em estufa bacteriológica⁴⁶. Para a realização deste procedimento, cada corpo-de-prova foi assepticamente colocado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura Tryptic Soy Broth. A seguir, os tubos de ensaio contendo os corpos-de-prova foram incubados em estufa bacteriológica e mantidos a 37°C por 7 dias. Após este período, foi observado que não houve crescimento visível nos meios de cultura dos tubos de ensaio para o material avaliado (Figura 5).

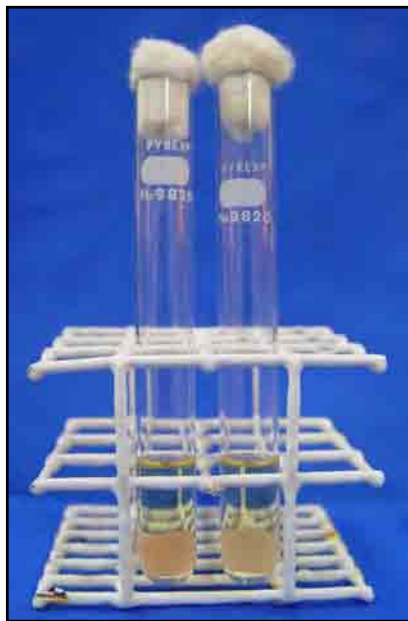


FIGURA 5: Corpos-de-prova esterilizados com óxido de etileno após 7 dias de incubação a 37°C

Contaminação e desinfecção dos corpos-de-prova

Os microrganismos selecionados para a contaminação da resina reembasadora foram os seguintes: *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positivo), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negativo), *C. albicans* ATCC 60193 (levedura) e *B. subtilis* ATCC 6633 (Gram-positivo esporulado).

Esses microrganismos foram selecionados de acordo com as recomendações publicadas recentemente no *Handbook of Disinfectants and Antiseptics*¹⁹, com base em médias científicas para indicação de microrganismos patogênicos.

Inicialmente, os microrganismos foram individualmente inoculados em meio de cultura e incubados em estufa bacteriológica¹². Para a realização desses procedimentos, os microrganismos selecionados foram individualmente inoculados em tubos de ensaios contendo 10 mL de Tryptic Soy Broth. A seguir, estes tubos foram incubados a 37°C por 24 horas (Figura 6).



FIGURA 6: Tubos de ensaio contendo o meio de cultura com os microrganismos inoculados

Para observar o crescimento dos microrganismos, os tubos de ensaio foram colocados em agitador de tubos e agitados vigorosamente por 30 segundos. Então, os tubos de ensaio foram

retirados do agitador e o grau de turvação presente nos mesmos foi avaliado pela correlação com os padrões da escala de McFarland. A partir do nível de crescimento constatado nos tubos de ensaio pela comparação com a escala de McFarland¹², foi possível obter uma alíquota do meio de cultura inoculado correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^7 ufc/mL para cada microrganismo avaliado.

Previamente à contaminação, um total de 240 corpos-de-prova do material avaliado foram individualmente colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura estéril (Tryptic Soy Broth)⁶². A seguir, uma alíquota correspondente a 10^7 ufc/mL⁴⁶ de cada microrganismo testado foi pipetada dos tubos de ensaio previamente inoculados e então transferida individualmente para cada um dos tubos de ensaio contendo os corpos-de-prova. Após a contaminação, estes tubos foram vigorosamente agitados em agitador de tubos e incubados a 37°C por 24 horas (Figura 7). É importante salientar que foram contaminados 60 corpos-de-prova para cada tipo de microrganismo selecionado (10 amostras de cada microrganismo em cada um dos seis grupos estudados).

Nesta fase, foram selecionados para o grupo controle positivo (G 0) 40 tubos de ensaio (10 de cada microrganismo) contendo as amostras do material testado⁴⁶. Neste grupo, os corpos-de-prova foram inoculados com os microrganismos e não foram submetidos aos procedimentos de desinfecção. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados como parâmetro para comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras desinfetadas.

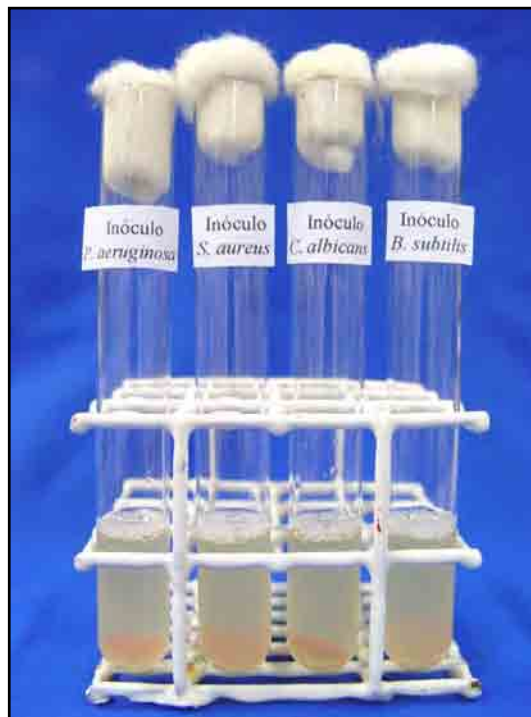


FIGURA 7: Corpos-de-prova contaminados individualmente com os microrganismos selecionados

Cada amostra do grupo controle positivo (G 0) foi removida dos tubos de ensaio incubados e então transferida para um outro tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. A seguir, esses tubos de ensaio foram agitados vigorosamente em agitador de tubos durante 1 minuto e deixados em repouso por 9 minutos. Posteriormente, cada tubo de ensaio foi rapidamente agitado para desprender qualquer célula microbiana aderente do corpo-de-prova para a solução resultante. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas a partir dessa solução resultante. Para isso, uma alíquota de 500 μL da solução resultante foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. Este último tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 500 μL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 4,5 μL de solução salina. Esse procedimento foi realizado seis vezes para cada

corpo-de-prova e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} foram obtidas^{29,46}.

As últimas quatro diluições seriadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram separadas para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo os meios de cultura selecionados para cada microrganismo²⁹: Mannitol Salt Agar para *S. aureus*; Muller Hinton Agar para *P. aeruginosa*; Sabouraud Dextrose Agar com 5 µg/mL de cloranfenicol para *C. albicans* e Tryptic Soy Agar para *B. subtilis*. Para este procedimento, os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas selecionadas foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio. A seguir, uma alíquota de 25 µL de cada diluição seriada selecionada, a partir da diluição de 10^{-6} até 10^{-3} , foi pipetada. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de uma placa de Petri contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. É importante enfatizar que os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicatas.

Os demais tubos de ensaio ($n = 200$) contendo as amostras da resina reembasadora foram selecionados para os grupos experimentais. Cada grupo experimental correspondeu a um dos seguintes tempos de irradiação em microondas: G V – 5 minutos, G IV – 4 minutos, G III – 3 minutos, G II – 2 minutos e G I – 1 minuto. Nestes grupos com 40 corpos-de-prova cada, as amostras foram contaminadas e submetidas aos procedimentos de desinfecção. Para isso, cada amostra contaminada foi cuidadosamente removida dos tubos de ensaio e então colocada em um recipiente contendo 200 mL de água destilada estéril. A seguir, cada recipiente foi colocado no centro do prato giratório do forno de microondas e submetido à irradiação em potência de 650 W em um dos tempos experimentais de irradiação (Figura 8). A potência adotada nos experimentos foi estabelecida com base em estudo prévio⁵¹.



FIGURA 8: Corpo-de-prova imerso em recipiente com 200 mL de água destilada estéril para ser submetido à irradiação no forno de microondas

Após a irradiação, cada amostra foi assepticamente removida do béquer e colocada em tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. Cada tubo foi vigorosamente agitado em agitador de tubos por 1 minuto, deixado em repouso por 9 minutos e novamente agitado para desprender qualquer célula microbiana do corpo-de-prova para a solução resultante. A seguir, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a obtenção das diluições seriadas e para a realização de semeadura para as amostras do grupo G 0 (controle positivo). As placas referentes aos grupos experimentais e controle foram igualmente submetidas à incubação a 37°C por 48 horas.

Esterilização em microondas a longo prazo

Com o objetivo de avaliar a efetividade do método de desinfecção proposto, os corpos-de-prova irradiados foram incubados em meio de cultura estéril por 7 dias²⁵. Para este procedimento, os corpos-de-prova irradiados foram colocados individualmente em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura TSB e incubados em estufa bacteriológica

a 37°C por 7 dias. Após este período, os tubos de ensaio incubados foram agitados em agitador de tubos e analisados por um microbiologista. A presença de turvação no meio de cultura foi considerada como indicadora de crescimento microbiológico.

Contagem de colônias

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri referentes às amostras do grupo G 0 (controle positivo) e às amostras dos grupos G V, G IV, G III, G II e G I foram submetidas à contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri foi posicionada em um contador de colônias digital²⁹. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), 8 corpos-de-prova (10 mm x 10 mm x 1 mm) para cada grupo experimental e 4 corpos-de-prova para o grupo controle positivo foram confeccionados da mesma forma que o descrito previamente. Duas amostras de cada grupo experimental e uma amostra do grupo controle foram individualmente inoculadas em tubos de ensaio com 10 mL de TSB contendo um dos microrganismos testados (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *C. albicans*). Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 48 horas. Após a incubação, as amostras do grupo controle positivo (G 0) foram imediatamente preparadas para MEV. As amostras dos grupos experimentais (G I, G II, G III, G IV e GV) foram imersas em água e irradiadas em microondas a 650 W nos tempos de exposição (1, 2, 3, 4 e 5 minutos) respectivos a cada grupo. A seguir, um desses corpos-de-prova irradiados foi preparado para MEV. O outro foi colocado em um

tubo de ensaio contendo 10 mL de TSB e incubado a 37°C por 7 dias antes do preparo para MEV.

Para a análise em MEV, os corpos-de-prova foram fixados em glutaraldeído 2,5% por 24 horas. Após este período, os corpos-de-prova foram desidratados por 15 minutos em cada uma das concentrações seriadas de álcool etílico: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. É válido ressaltar que os corpos-de-prova foram submetidos a duas imersões por 15 minutos nas soluções de álcool etílico a 90 e 100%, com renovação das soluções a cada imersão. Os corpos-de-prova foram colocados em dessecador por 72 horas e, em seguida, foram montados em *stubs* (Figura 9) e submetidos à metalização áurica (Figura 10). Os corpos-de-prova metalizados foram examinados em um microscópio eletrônico de varredura DSM 940 A em aumentos de 1.000, 2.500 e 5.000 vezes, e as imagens foram digitalizadas.



FIGURA 9: Corpos-de-prova montados em *stubs*



FIGURA 10: Corpos-de-prova metalizados

4.5- Planejamento Experimental

O número de corpos-de-prova utilizado neste estudo foi determinado com base nos resultados obtidos no teste piloto. Este trabalho teve por objetivo verificar a efetividade de diferentes tempos de exposição às microondas na desinfecção de uma resina reembasadora

contaminada com microrganismos patogênicos. Sendo assim, foi verificada a variável dependente Unidade Formadora de Colônias (ufc). Para essa variável foram estabelecidos os fatores de variação Microrganismo, em 4 níveis (Pa, Sa, Ca e Bs), e Tempo de Exposição, em 6 níveis (G 0, G I, G II, G III, G IV e G V). Definiu-se, então, que seriam necessárias 10 repetições para cada grupo com um dos microrganismos. O total amostral obtido foi, portanto, de 240 corpos-de-prova para a variável ufc.

Para determinar a efetividade de diferentes tempos de exposição às microondas na desinfecção da resina avaliada, foi necessário calcular o número de microrganismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido com e sem o procedimento de desinfecção pela irradiação em microondas. Para o cálculo desses valores, as colônias viáveis presentes nas placas de Petri de cada duplicata foram contadas com o contador de colônias digital. É importante ressaltar que, para cada duplicata, a contagem do número de colônias foi realizada para cada uma das diluições semeadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}). Para o grupo G 0 (controle positivo), foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido, para cada microrganismo, o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Após a obtenção desse valor em cada duplicata, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado. Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (3, 4, 5 ou 6), 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 μ L para cada diluição. Os valores de ufc/mL

obtidos foram deixados em notação científica e foi obtida então a média aritmética dos valores das duplicatas de cada amostra.

Os valores de ufc/mL são extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Para facilitar algumas interpretações dos resultados obtidos, os valores de ufc/mL obtidos foram transformados para logaritmo na base dez. Mesmo assim, em alguns casos não puderam ser garantidas as pressuposições para a validade da análise de variância na avaliação do número médio de colônias viáveis. Então, os resultados obtidos foram analisados por um método não-paramétrico. Assim, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, que avaliou os postos médios das contagens de microrganismos após a transformação para logaritmo. Esse teste também foi utilizado com o objetivo de acompanhar aqueles adotados por parte significativa da literatura relacionada a este estudo. Com isso, foi possível estabelecer comparações dos resultados deste trabalho com os obtidos por outras pesquisas relacionadas. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado diretamente sobre 24 condições determinadas pela combinação dos 4 microrganismos selecionados e dos 6 tempos de exposição avaliados. Complementando o teste de Kruskal-Wallis foram realizadas comparações múltiplas não-paramétricas dos postos médios dois a dois 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.

5 Resultado

Avaliação dos valores de ufc/mL obtidos para os corpos-de-prova dos grupos experimentais

Após 48 horas de incubação a 37°C, as sementeiras das placas de Petri referentes aos corpos-de-prova dos grupos G III, G IV e G V (3, 4 e 5 minutos de irradiação, respectivamente) não apresentaram colônias viáveis para os quatro microrganismos avaliados (Figura 11). Além disso, os tubos de TSB para as amostras dos grupos G V, G IV e G III demonstraram ausência de crescimento microbiológico, após 7 dias de incubação a 37°C (Figura 12). Dessa forma, os resultados evidenciaram que as amostras dos grupos G III, G IV e G V demonstraram uma efetiva esterilização, após irradiação a 650 W.

Considerando que os valores de ufc/mL foram nulos para todas as amostras dos grupos G III, G IV e G V, uma vez que não houve crescimento de microrganismos, não foi aplicada a análise estatística para os resultados desses grupos.

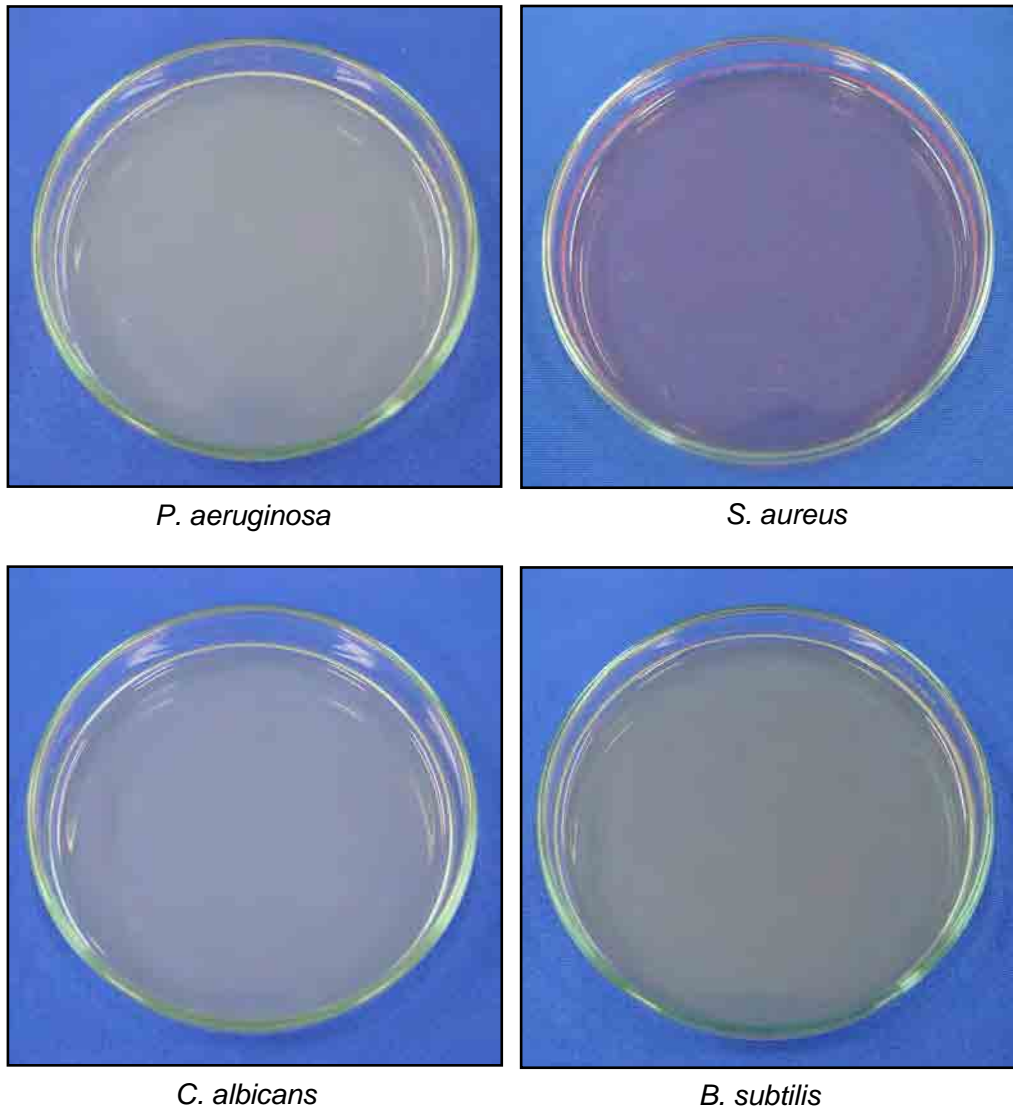


FIGURA 11: Placas de Petri com as sementeiras dos microrganismos referentes aos grupos G III, G IV e G V



FIGURA 12: Corpos-de-prova referentes aos grupos G III, G IV e G V para os microrganismos avaliados, após 7 dias de incubação a 37°C

Os valores de ufc/mL referentes aos corpos-de-prova do grupo G II (2 minutos de irradiação), contaminados com *S. aureus* (Sa), *P. aeruginosa* (Pa) e *B. subtilis* (Bs), apresentaram uma redução de colônias viáveis. Devido à presença de zeros, foi acrescentada uma unidade a cada valor de contagem possibilitando o cálculo de logaritmo. As contagens foram transformadas para logaritmo e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Além disso, os resultados demonstraram crescimento microbiológico em alguns tubos de TSB com os corpos-de-prova do grupo G II contaminados com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, durante 7 dias de incubação a 37°C (Tabela 2).

Neste mesmo grupo (G II), foi observado que, para os corpos-de-prova contaminados com *C. albicans* (Ca), as placas de Petri não

apresentaram colônias viáveis e também não houve crescimento microbiológico nos tubos de TSB, após 7 dias de incubação a 37°C (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1: Valores originais em ufc/mL e valores originais transformados para logaritmo na base dez para as amostras da resina Tokuso Rebase Fast do grupo G II, referentes aos microrganismos Pa, Sa, Ca e Bs.

Corpos-de-prova	Valores originais em ufc/mL				Logaritmo dos valores originais			
	Pa	Sa	Ca	Bs	Pa	Sa	Ca	Bs
1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0	4,0E+04	0	0	0,00	4,60	0,00	0,00
5	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 2: Efetividade da desinfecção em longo prazo dos corpos-de-prova do grupo G II.

	Pa	Sa	Ca	Bs
+	1	2	0	4
-	9	8	10	6

+: turvação nos tubos de TSB

-: ausência de turvação nos tubos de TSB

De acordo com as Tabelas 1 e 2, foi possível constatar que o crescimento microbiológico verificado no grupo G II diferiu de acordo com o tipo de microrganismo estudado, exceto *C. albicans*. Os corpos-de-prova contaminados com *B. subtilis*, após irradiação, não apresentaram colônias viáveis nas placas de Petri, porém, 4 corpos-de-prova dos 10 avaliados apresentaram crescimento microbiológico nos tubos de TSB, após a incubação por 7 dias a 37°C (Tabela 2). Os corpos-de-prova contaminados com *P. aeruginosa* (n = 10) não demonstraram colônias viáveis nas placas, mas verificou-se crescimento nos tubos de TSB em 1 das amostras avaliadas (Tabela 2). Observou-se também que os corpos-de-prova contaminados com *S. aureus* apresentaram, nas placas, ausência de colônias para 9 corpos-de-prova e pequeno número de colônias viáveis para 1 corpo-de-prova. Além disso, foi observado crescimento nos tubos de TSB em 2 corpos-de-prova avaliados após a incubação por 7 dias a 37°C (Tabela 2). Dessa forma, os resultados evidenciaram que, para *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, as amostras avaliadas dos grupos G II (exceto *C. albicans*) apresentaram desinfecção, após irradiação a 650 W por 2 minutos. Neste mesmo grupo (G II), as amostras contaminadas com *C. albicans*, após irradiação em microondas a 650 W por 2 minutos, não apresentaram colônias viáveis nas placas de Petri nem crescimento microbiológico nos tubos de TSB após incubação por 7 dias a 37°C.

Os valores de ufc/mL referentes aos corpos-de-prova do grupo G I (1 minuto de irradiação), contaminados com *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *B. subtilis*, bem como o crescimento microbiológico nos tubos de TSB, após 7 dias de incubação a 37°C para todos os corpos-de-prova estudados, estão descritos na Tabela 3 e 4, respectivamente. As placas de Petri referentes às amostras do grupo G I estão ilustradas na Figura 13. Os tubos de TSB com as amostras irradiadas desse mesmo grupo podem ser visualizados na Figura 14.

Tabela 3: Valores originais em ufc/mL e valores originais transformados para logaritmo na base dez para as amostras da resina Tokuso Rebase Fast do grupo G I, referentes aos microrganismos Pa, Sa, Ca e Bs.

Corpos-de-prova	Valores originais em ufc/mL				Log dos valores originais			
	Pa	Sa	Ca	Bs	Pa	Sa	Ca	Bs
1	1,0E+05	4,5E+06	8,0E+03	0,0E+00	5,00	6,65	3,90	0,00
2	1,0E+05	3,9E+06	8,0E+03	2,0E+02	5,00	6,59	3,90	2,30
3	0,0E+00	0,0E+00	6,0E+03	2,4E+03	0,00	0,00	3,78	3,38
4	8,0E+04	5,5E+06	0,0E+00	2,0E+02	4,90	6,74	0,00	2,30
5	1,2E+06	1,2E+06	1,6E+04	0,0E+00	6,08	6,08	4,20	0,00
6	1,4E+05	1,9E+04	1,4E+04	1,2E+03	5,15	4,28	4,15	3,08
7	1,0E+03	8,8E+05	8,0E+03	0,0E+00	3,00	5,94	3,90	0,00
8	9,0E+03	8,5E+07	4,0E+03	0,0E+00	3,95	7,93	3,60	0,00
9	1,2E+03	2,3E+06	3,4E+04	0,0E+00	3,08	6,36	4,53	0,00
10	6,0E+03	5,0E+06	1,0E+04	0,0E+00	3,78	6,70	4,00	0,00

Tabela 4: Efetividade da desinfecção em longo prazo dos corpos de prova do grupo G I.

	Pa	Sa	Ca	Bs
+	10	10	10	10
-	0	0	0	0

+: turvação nos tubos de TSB

-: ausência de turvação nos tubos de TSB

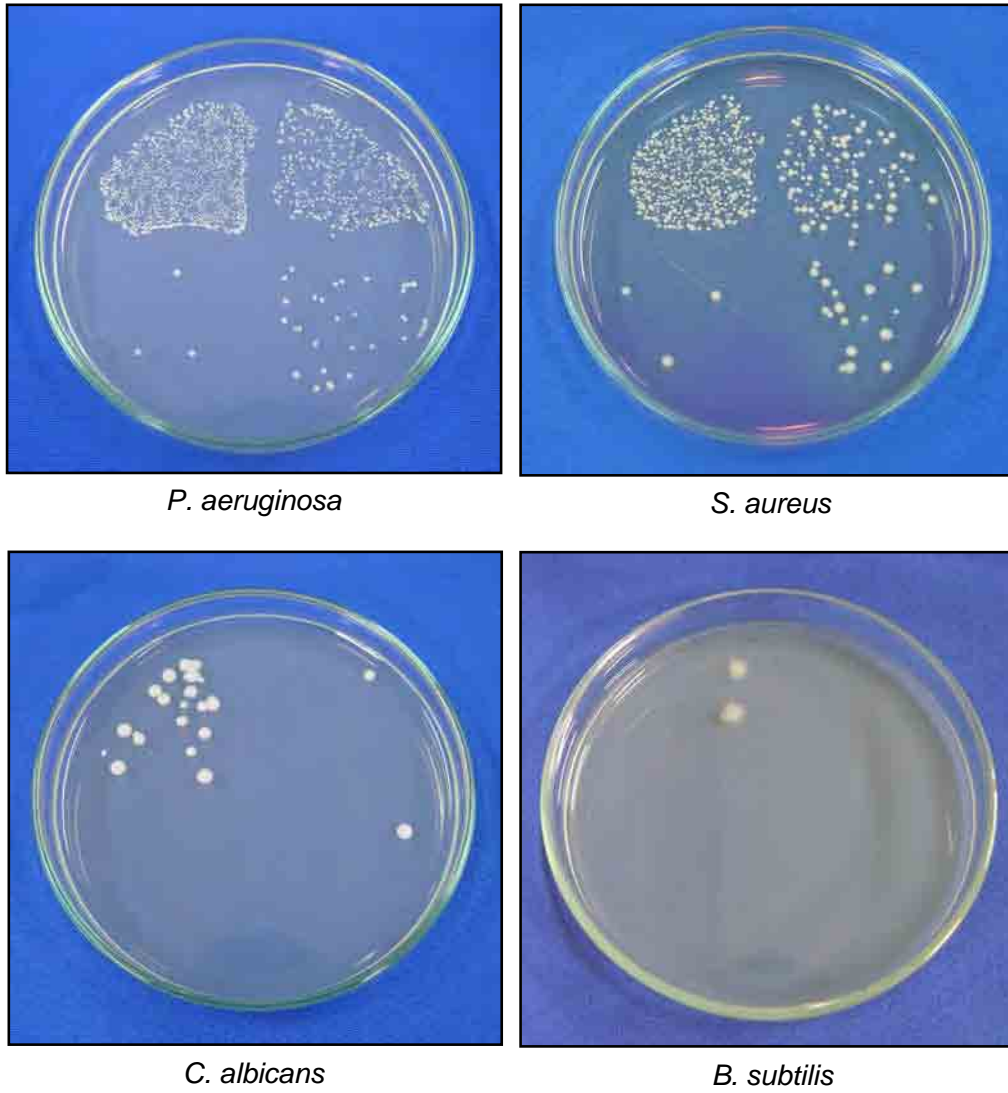


FIGURA 13: Placas de Petri com as sementeiras dos microrganismos referentes ao grupo GI

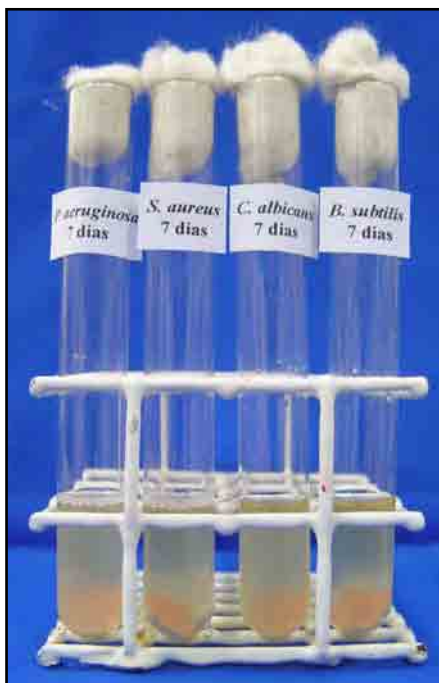


FIGURA 14: Corpos-de-prova referentes ao grupo G I para os microrganismos avaliados, após 7 dias de incubação a 37°C

Analisando a Tabela 3, pôde-se observar que os corpos-de-prova correspondentes ao grupo G I apresentaram crescimento microbiológico nas placas de Petri, após 48 horas de incubação à 37°C. Além disso, foi verificado crescimento microbiológico nos tubos de TSB, após 7 dias de incubação a 37°C, para todos os corpos-de-prova estudados (Tabela 4).

O crescimento microbiológico nos tubos de TSB dos grupos G II e G I foi constatado por meio da turvação nos tubos, já no primeiro dia de incubação. Em seguida, novo plaqueamento dessas amostras foi realizado com o objetivo de confirmar se o crescimento microbiológico correspondia ao microrganismo inoculado. Assim, a hipótese de contaminação das amostras por algum microrganismo que não o inoculado experimentalmente foi descartada para todas amostras, por meio da análise da morfologia das

colônias nas placas de Petri. Dessa forma, os resultados evidenciaram que, para os quatro microrganismos estudados, as amostras analisadas do grupo G I demonstraram desinfecção, após irradiação a 650 W.

Avaliação dos valores de ufc/mL obtidos para os corpos-de-prova do grupo controle positivo

As placas de Petri semeadas correspondentes aos corpos-de-prova do grupo controle positivo (G 0) apresentaram crescimento microbiano, após 48 horas de incubação.

O número de colônias de cada duplicata foi contado e os valores de ufc/mL foram calculados. Os valores originais das médias das duplicatas em ufc/mL e os valores originais transformados para logaritmo na base dez dos corpos-de-prova do grupo G 0 (não desinfetado) para os microrganismos *P. aeruginosa* (Pa), *S. aureus* (Sa), *C. albicans* (Ca) e *B. subtilis* (Bs) estão descritos nas Tabelas 5. As placas referentes aos corpos-de-prova desse grupo estão ilustradas na Figura 15.

Tabela 5: Valores originais em ufc/mL e valores originais transformados para logaritmo na base dez para as amostras da resina Tokuso Rebase Fast do grupo G 0, referentes aos microrganismos Pa, Sa, Ca e Bs.

Corpos- de-prova	Valores originais em ufc/mL				Log dos valores originais			
	Pa	Sa	Ca	Bs	Pa	Sa	Ca	Bs
1	1,6E+08	5,7E+09	4,4E+06	1,6E+06	8,20	9,76	6,64	6,20
2	3,9E+08	5,6E+09	1,6E+06	2,4E+06	8,59	9,75	6,20	6,38
3	2,1E+08	8,9E+09	2,8E+06	2,0E+06	8,32	9,95	6,45	6,30
4	5,1E+08	8,3E+09	5,6E+06	2,3E+06	8,71	9,92	6,75	6,36
5	1,9E+08	2,7E+09	3,2E+06	1,8E+06	8,28	9,43	6,51	6,26
6	1,2E+09	1,2E+10	2,9E+06	2,2E+06	9,08	10,06	6,46	6,34
7	1,3E+08	2,4E+09	7,1E+06	1,8E+06	8,11	9,38	6,85	6,26
8	4,5E+08	1,2E+10	6,1E+06	2,4E+06	8,65	10,08	6,79	6,38
9	6,0E+08	3,6E+09	6,5E+06	3,7E+06	8,78	9,56	6,81	6,57
10	3,0E+08	2,2E+09	6,0E+06	3,7E+06	8,48	9,34	6,78	6,57

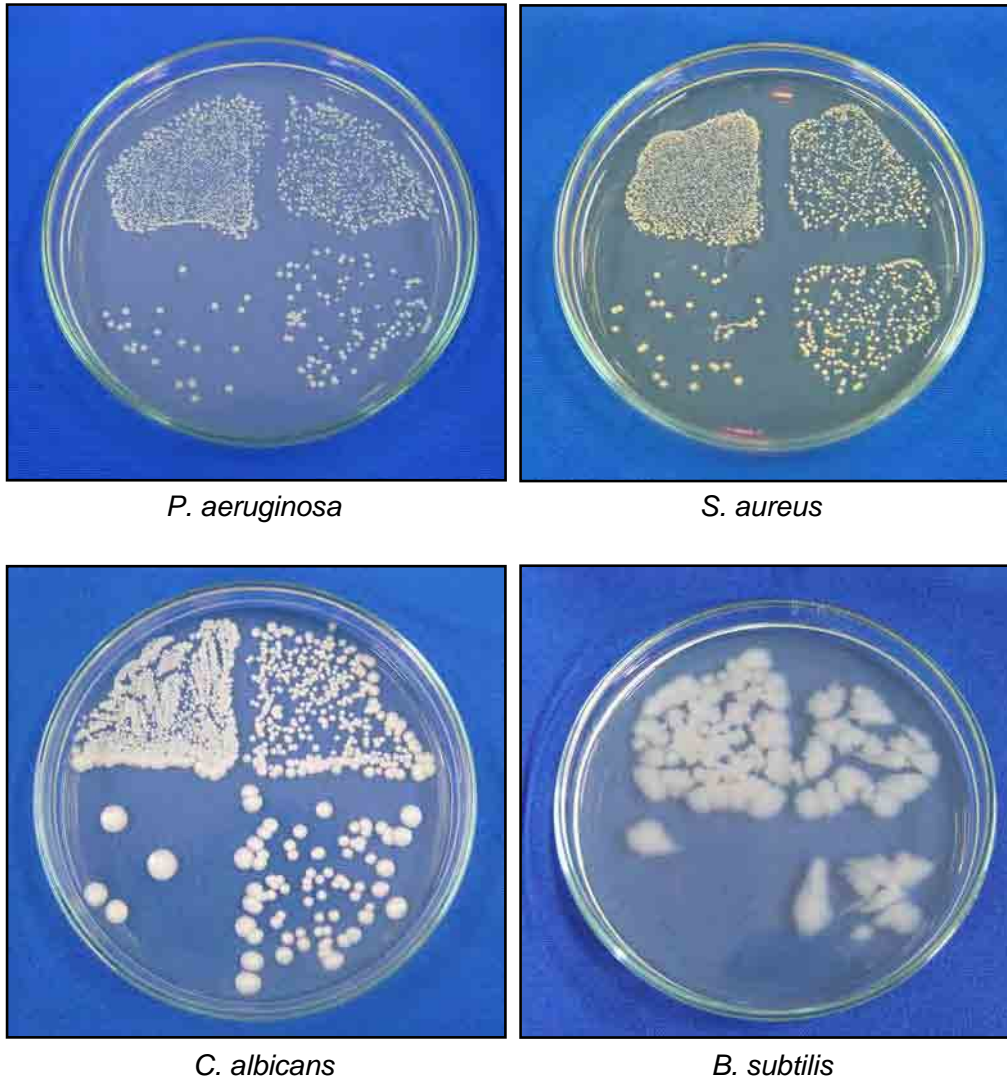


FIGURA 15: Placas de Petri com as sementeiras dos microrganismos referentes ao grupo G 0 (controle positivo)

Análise comparativa dos valores de ufc/mL obtidos para os corpos-de-prova dos grupos G 0 e G I

Os resultados obtidos demonstraram que os grupos G 0 e G I apresentaram crescimento microbiológico significativo para todos os microrganismos avaliados (Tabelas 3 e 5). Dessa forma, os resultados obtidos para esses dois grupos foram comparados estatisticamente. A seguir, são apresentados os resultados da comparação entre os grupos G 0 e G I.

De acordo com as Tabelas 3 e 5, é possível observar que os valores originais de ufc/mL, além de elevados, apresentam uma distribuição assimétrica e variabilidade muito acentuada entre os microrganismos avaliados. 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 dados. Então, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os valores de ufc/mL dos microrganismos Pa, Sa, Ca e Bs em cada um dos grupos. Neste caso, são avaliados os postos médios dos valores de ufc/mL, após a transformação para logaritmo.

Pela Tabela 6, é possível observar que há evidência de diferença significativa entre postos médios dos valores de ufc/mL ($p < 0,001$). Para identificar os microrganismos com valores diferentes, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Dunn.

O resultado do teste de Dunn também pode ser visualizado na Tabela 6, de forma que postos médios de um mesmo grupo com letras iguais não são significativamente diferentes ao nível de 5%. Assim, para o grupo G 0, os valores de Pa e Sa foram significativamente superiores em relação aos valores de Ca e Bs [(Pa = Sa) > (Ca = Bs)]. Já, para o grupo G I, o valor de Bs foi estatisticamente inferior em relação aos valores dos demais

microrganismos, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os postos médios de Pa e Sa e de Pa e Ca. Também pode ser verificado que, para esse mesmo grupo, o valor de Sa foi estatisticamente superior ao de Ca ($Sa = Pa \geq Ca > Bs$).

Tabela 6: Comparação dos valores em Log(ufc/mL) dos microrganismos Pa, Sa, Ca e Bs entre os grupos G 0 e G I.

Grupo	Estatística Descritiva	Microrganismo			
		Pa	Sa	Ca	Bs
G 0	Média	8,52	9,72	6,62	6,36
	Desvio padrão	0,30	0,28	0,21	0,12
	Mediana	8,53	9,75	6,70	6,35
	Posto médio	25,5 ^b	35,5 ^b	14,0 ^a	7,1 ^a
G I	Média	3,99	5,73	3,60	1,11
	Desvio padrão	1,71	2,21	1,29	1,46
	Mediana	4,43	6,48	3,90	0,00
	Posto médio	22,2 ^{bc}	32,2 ^c	19,8 ^b	8,0 ^a

A avaliação de diferença significativa entre postos médios dos valores de ufc/mL dos microrganismos estudados pode ser acompanhada visualmente pelo gráfico de médias da Figura 16. Os postos médios guardam, neste trabalho, estreita relação com as médias, de forma que as conclusões obtidas podem ser estendidas para elas.

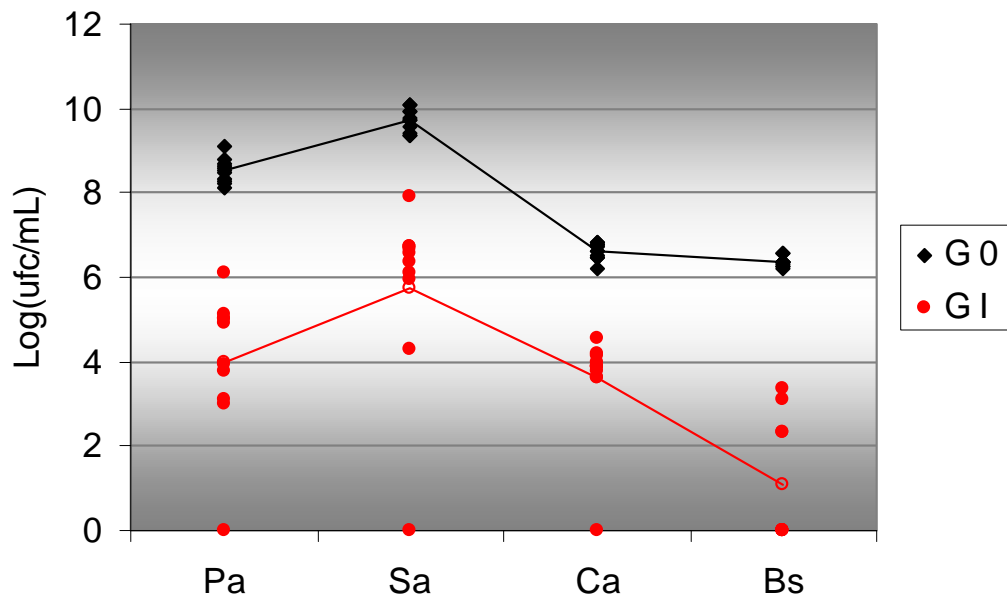


FIGURA 16: Representação gráfica de Log(ufc/mL) dos microrganismos Pa, Sa, Ca e Bs para os grupos G 0 e G 1 (as linhas poligonais unem as médias)

Análise da microscopia eletrônica de varredura para os grupos avaliados

A análise em microscopia eletrônica de varredura dos corpos-de-prova do grupo G 0 (controle positivo) demonstrou a presença de elevado número de microrganismos sobre a resina avaliada. Os microrganismos apresentaram-se sem alterações morfológicas (Figuras 17 A e 18 A).

A análise em MEV das amostras esterilizadas dos grupos irradiados (G II para *C. albicans*, G III, G IV e G V) revelou evidência de danos à morfologia das células dos microrganismos testados, com irregularidades de superfície, orifícios, modificação da forma e também desintegração celular (Figura 17 C, D, E e F e Figura 18 D, E e F). Além disso, para *C. albicans*, foi verificado que parte dos microrganismos não viáveis foi removida da superfície da resina, após a irradiação por microondas das amostras em água, o que não ocorreu com as bactérias avaliadas, que permaneceram na superfície da resina acrílica após a imersão em água e a irradiação por microondas. A MEV referente às amostras esterilizadas e incubadas por 7 dias não revelou diferenças em relação à MEV dos corpos-de-prova preparados imediatamente após a irradiação por microondas.

A análise em microscopia das amostras desinfetadas demonstrou que os corpos-de-prova irradiados e incubados por 7 dias apresentaram maior quantidade de microrganismos na superfície da resina acrílica, quando comparados aos corpos-de-prova preparados para MEV logo após a irradiação. A quantidade de microrganismos presentes nessas amostras, após 7 dias de incubação, foi semelhante ao grupo G 0 (controle positivo).

As análises microscópicas das amostras avaliadas dos microrganismos *C. albicans* e *B. subtilis* podem ser visualizadas nas Figuras

17 e 18, respectivamente. Na Figura 17, observam-se amostras da resina acrílica contaminada com *C. albicans* dos grupos G 0, G I, G II, G III, G IV e G V (A, B, C, D, E e F respectivamente), sendo os corpos-de-prova irradiados referentes aos preparados para MEV imediatamente após a exposição às microondas. A Figura 18 ilustra amostras da resina reembasadora contaminada com *B. subtilis* dos grupos G 0, G I, G II, G III, G IV e G V (A, B, C, D, E e F respectivamente). As amostras irradiadas correspondem aos corpos-de-prova preparados para MEV após irradiação e incubação por 7 dias.

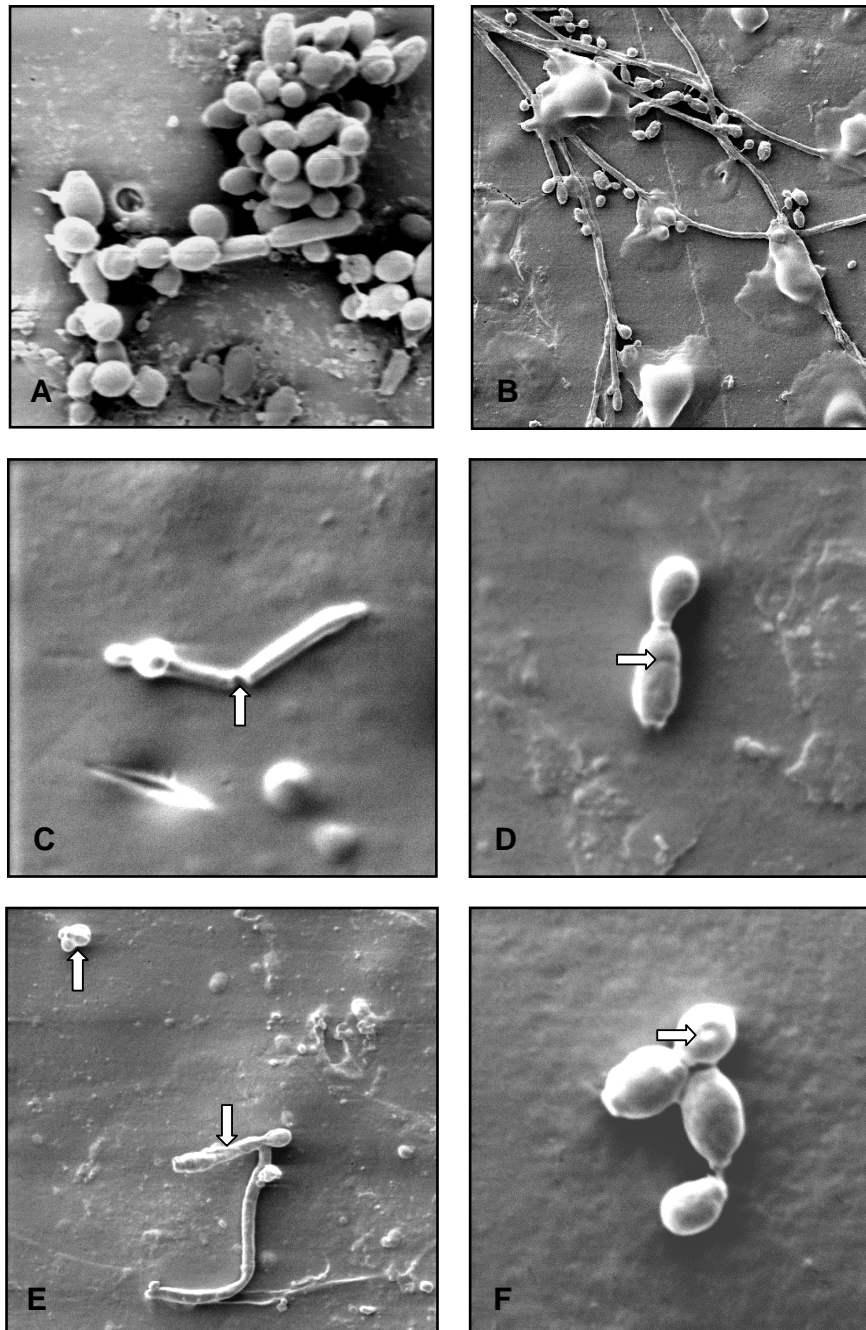


FIGURA 17: Células (leveduras e hifas) de *C. albicans* na superfície da resina avaliada. Os grupos G 0, G I, G II, G III, G IV, e GV estão representados em A (2500 x), B (1000 x), C (2500 x), D (5000 x), E (1000 x) e F (5000 x), respectivamente. As setas indicam alteração morfológica do microrganismo.

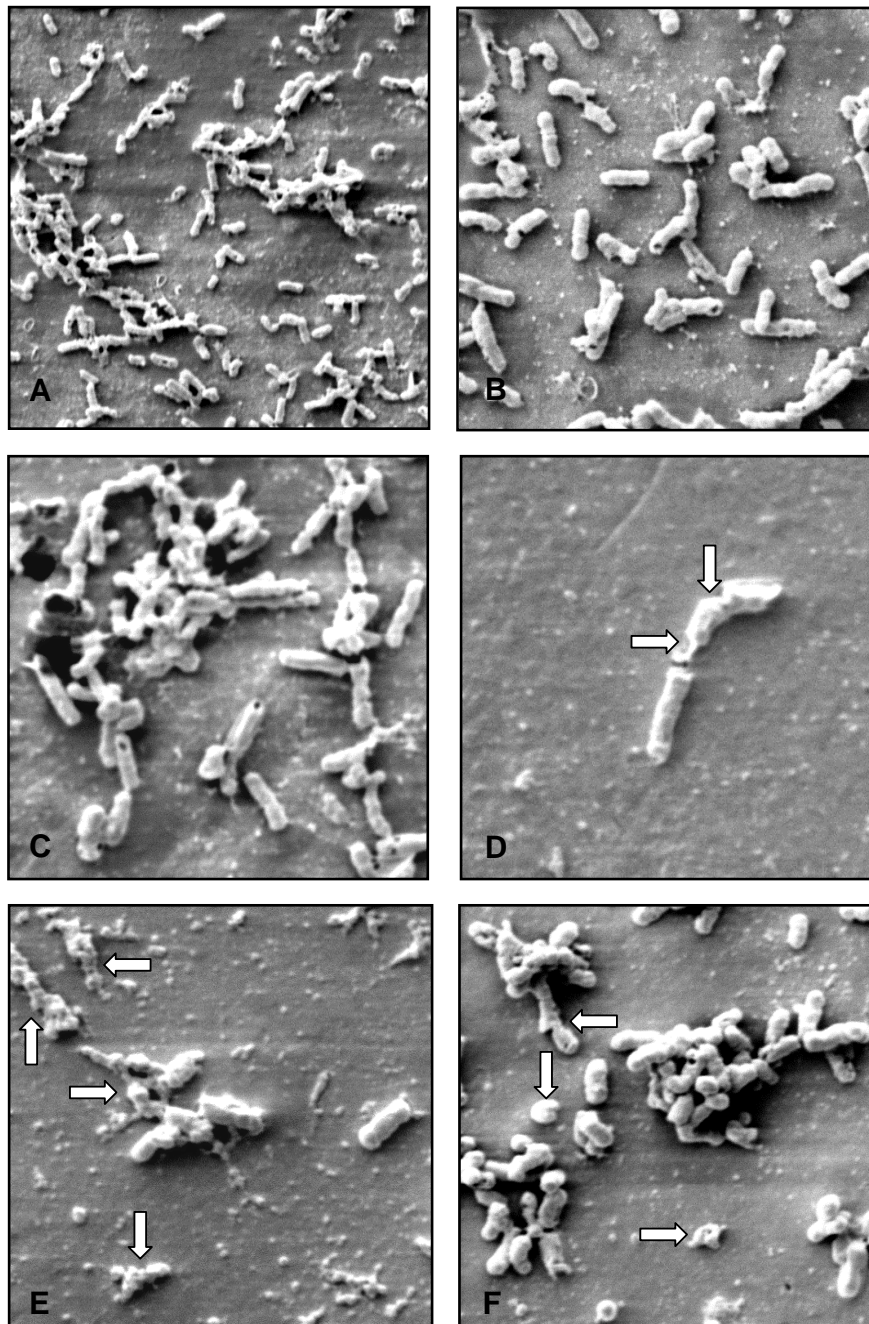


FIGURA 18: Células de *B. subtilis* na superfície da resina avaliada. Os grupos G 0, G I, G II, G III, G IV, e GV estão representados em A (2500 x), B, C , D , E e F (5000 x), respectivamente. As setas indicam alteração morfológica na célula do microrganismo.

6 *Discussão*

Durante a realização do reembasamento imediato, freqüentemente ocorre extravasamento de resina acrílica para a superfície externa da prótese. A remoção desse excesso de resina deixa a superfície da prótese irregular, áspera e rugosa, tornando-se necessário um novo polimento. Quando removidas da cavidade bucal, as próteses devem ser desinfetadas pelo cirurgião-dentista uma vez que podem estar contaminadas com microrganismos patogênicos tanto em sua parte externa quanto interna, devido às porosidades presentes na resina acrílica^{18,46}. Da mesma forma, após os procedimentos laboratoriais, o técnico de laboratório deveria realizar uma nova desinfecção das próteses, já que essas podem ter sido contaminadas durante os procedimentos de acabamento e polimento^{42,80}. Assim, procedimentos adequados de desinfecção de próteses são necessários para um controle efetivo da contaminação cruzada entre a clínica odontológica e o laboratório de prótese.

A irradiação por microondas tem sido sugerida como um método alternativo para desinfecção de próteses dentárias^{8,9,25,62,79}. Alguns estudos têm avaliado a irradiação por microondas como meio de desinfecção de alimentos²³, lentes de contato^{34,63}, aparelhos inaladores para sedação com óxido nítrico⁸³, esponjas de uso doméstico³⁷ e roupas íntimas contaminadas com *C. albicans*²⁸. Além disso, tem sido relatada a utilização da irradiação por microondas no tratamento de infecções como prostatite⁴⁵ e também na esterilização de materiais utilizados em laboratórios de análises clínicas⁴³, materiais para cultura microbiológica¹², instrumentos odontológicos^{36,74} e cirúrgicos⁶⁴ e recipientes plásticos para cultura de células⁶⁶. Há ainda alguns estudos que avaliaram a inativação de cepas patogênicas de microrganismos esporulados e não esporulados^{27,50,81}.

Os resultados obtidos demonstraram que a irradiação por microondas a 650 W demonstrou ser efetiva para a esterilização dos corpos-de-prova contaminados com os quatro microrganismos estudados (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *B. subtilis*) após 3, 4 e 5 minutos de exposição (G III, G IV e G V, respectivamente). Além disso, corpos-de-prova contaminados com *C. albicans* foram esterilizados após 2 minutos de irradiação (G II) a 650 W. Essa esterilização foi constatada tanto pela ausência de colônias viáveis nas placas de Petri, quanto pela ausência de crescimento microbiológico nos tubos de TSB com as amostras irradiadas durante 7 dias de incubação a 37°C. Os resultados deste estudo estão de acordo com o trabalho realizado por Neppelenbroek et al.⁵¹ no qual verificaram que a irradiação por microondas numa potência de 650 W, por um período de 6 minutos, foi efetiva na esterilização de corpos-de-prova de resinas acrílicas. Os corpos-de-prova foram incubados para propiciar o crescimento dos microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *B. subtilis* e, então, imersos em 200 mL de água para serem submetidos às microondas. Os resultados demonstraram que, após a irradiação, os corpos-de-prova tornaram-se estéreis, uma vez que não houve crescimento de microrganismos após dois períodos de incubação utilizados (48 horas e 7 dias)⁵¹. Dando continuidade, Silva et al.⁷¹ contaminaram próteses totais com *C. albicans* e as submetem às microondas, utilizando o mesmo tempo e potência do estudo anterior. Esses autores observaram que as próteses foram esterilizadas.

Na maioria dos estudos relatados na literatura que utilizaram as microondas como meio de desinfecção, os corpos-de-prova foram irradiados a seco. Rohrer e Bulard⁶² também avaliaram a efetividade das microondas na esterilização de próteses removíveis totais e parciais. As próteses foram contaminadas com suspensões individuais e mistas de quatro bactérias aeróbias (*S. aureus*, *S. epidermis*, *K. pneumoniae* e *B. subtilis*) e

um fungo (*C. albicans*) e em seguida, irradiadas a 720 W durante 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 15 minutos. As próteses foram irradiadas estaticamente e também acopladas a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores. Esse dispositivo foi sugerido uma vez que as microondas são propagadas em linha reta, de forma que a distribuição de energia não é uniforme nem homogênea no interior do forno. Os autores observaram que, quando as próteses foram expostas às microondas estaticamente, não foi obtida esterilização. Porém, se acopladas ao dispositivo, as próteses contaminadas com suspensões individuais de microrganismo foram esterilizadas após 8 minutos de irradiação, enquanto que as contaminadas com suspensões mistas de microrganismos foram esterilizadas após 10 minutos de exposição. Entretanto, esse dispositivo rotacional tridimensional não está disponível comercialmente. Devido a essa limitação, Webb et al.⁷⁹ avaliaram a efetividade de um forno de microondas doméstico na esterilização de próteses contaminadas com *C. albicans* e *S. gordonii*. As próteses foram irradiadas em diferentes potências (604 e 350 W) e por vários períodos de exposição (1, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos). Os autores observaram que as próteses foram esterilizadas após irradiação a 604 W nos períodos de 2 a 10 minutos e a 350 W de 6 a 10 minutos. Baysan et al.⁹ avaliaram a efetividade da energia de microondas na desinfecção de um material reembasador resiliente contaminado com *C. albicans* e *S. aureus*. Foram avaliados três procedimentos de desinfecção: as amostras foram submetidas à desinfecção por microondas a 650 W por 5 minutos; as amostras foram deixadas a seco durante a noite (5 horas) em temperatura ambiente; e as amostras foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante a noite. Os autores observaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os procedimentos avaliados, sendo que a imersão em hipoclorito de sódio foi considerada mais efetiva que a irradiação por microondas. Além disso, nenhum método foi bactericida, e apenas a imersão

em hipoclorito de sódio demonstrou ser fungicida. Os resultados obtidos no estudo de Dixon et al.²⁵ demonstraram que os corpos-de-prova não são adequadamente expostos às microondas quando as amostras são colocadas diretamente no prato giratório do forno de microondas. Porém, quando as amostras foram imersas em água, os corpos-de-prova de resinas reembasadoras resilientes e de base de prótese, contaminadas com *C. albicans*, tornaram-se estéreis após 5 minutos de irradiação em potência máxima. Segundo os autores, a água promove um aquecimento uniforme dos materiais, favorecendo a inativação dos microrganismos, inclusive daqueles no interior dos poros dos materiais. Friedrich e Phillips²⁸ observaram que a irradiação por microondas, em potência máxima por 5 minutos, foi efetiva em esterilizar roupas íntimas femininas de algodão contaminadas com *C. albicans*, quando as amostras foram previamente umedecidas com solução salina. Já quando as amostras foram irradiadas a seco, a quantificação de colônias foi igual ao observado nas amostras controle (não irradiadas). Segundo Fitzpatrick et al.²⁷, a irradiação por microondas a 1000 W durante 12 segundos, por cinco vezes consecutivas, não foi efetiva em esterilizar tubos de vidro contendo esporos secos e tiras umedecidas de *B. subtilis*. Entretanto, quando o mesmo procedimento foi realizado utilizando-se tubos com suspensão em solução salina de *S. aureus* e tubos adequadamente selados com esporos de *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* umedecidos em água destilada, a esterilização das amostras foi obtida. Os autores concluíram que a esterilização por microondas é possível quando a amostra é umedecida suficientemente, uma vez que a água atua na coagulação de proteínas durante a esterilização. Najdovski et al.⁵⁰ verificaram que bactérias vegetativas (*S. piogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) presentes em suspensões foram eliminadas após 5 minutos de exposição às microondas a 650 W. Um tempo de exposição superior (10 minutos) na mesma potência foi necessário para a eliminação

das suspensões de *E. faecalis*, e suspensões aquosas dos esporos bacterianos de *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* foram eliminadas após a irradiação a 1400 W durante 10 e 20 minutos, respectivamente. Entretanto, suspensões a seco dos esporos avaliados não foram inativados, mesmo após 20 minutos de exposição às microondas a 1400 W. Considerando esses resultados, os autores sugeriram que a desinfecção em forno de microondas convencional é efetiva quando o material a ser irradiado apresenta quantidade suficiente de água. Conforme observado no presente estudo e nos estudos citados^{25,27,28,50,51,71}, a imersão das amostras em água provavelmente favoreceu a inativação dos microrganismos submetidos à irradiação por microondas, já que as células dos microrganismos podem ter sido rompidas por meio da pressão osmótica da água, pois a água destilada estéril, na qual as amostras contaminadas foram imersas, é hipotônica em relação ao conteúdo de solutos no interior das células, o que favorece o fluxo de água para dentro das células, rompendo-as⁵⁴.

Quando os corpos-de-prova foram irradiados por 2 minutos (G II), a efetividade do procedimento de esterilização/desinfecção variou de acordo com o tipo de microrganismo estudado. Assim, para *C. albicans*, esse tempo de exposição foi efetivo para esterilizar os corpos-de-prova, visto que não houve formação de colônias viáveis nas placas nem turvação nos tubos de TSB com as amostras irradiadas após 7 dias de incubação a 37°C. Entretanto, para os demais microrganismos (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*), não foi observado crescimento bacteriano nas placas de Petri, e algumas amostras apresentaram crescimento microbiológico nos tubos de TSB após 7 dias de incubação (Tabela 2). Portanto, foi verificado que, para as amostras contaminadas com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, a irradiação por microondas a 650 W durante 2 minutos (G II) promoveu desinfecção do material estudado. Sanborn et al.⁶⁶ demonstraram que a irradiação por microondas em potência máxima foi efetiva em esterilizar

recipientes plásticos para cultura de células somente após 3 minutos de exposição. Esses autores também observaram que, após 2 minutos de irradiação, as amostras contaminadas por *P. vulgaris*, *S. faecium*, *C. equi*, *B. alvei* e *B. globigii* apresentaram crescimento bacteriano, enquanto que as amostras contaminadas por *E. coli*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae* e *S. lutea* não apresentaram crescimento bacteriano. Griffith et al.³¹ verificaram que a irradiação por microondas a 650 W, durante 2 minutos, não foi efetiva em esterilizar cateteres de polietileno contaminados com *Proteus* sp. Os autores demonstraram que a esterilização das amostras foi obtida somente após 6 minutos de irradiação a 650 W. Goodson et al.³⁰ avaliaram clinicamente a efetividade de um agente de limpeza quando utilizado em combinação com a irradiação em microondas por 2 minutos. Os resultados demonstraram que próteses totais acrílicas foram efetivamente descontaminadas quando o agente de limpeza foi utilizado em conjunto com a irradiação em microondas. Webb et al.⁷⁹ também verificaram que a irradiação por microondas, durante 2 minutos, foi efetiva em esterilizar próteses contaminadas com *C. albicans*, quando a potência utilizada foi de 604 W. Por outro lado, Rohrer e Bulard⁶² não verificaram esterilização em próteses contaminadas após 2 minutos de irradiação a 720 W, inclusive quando as próteses foram contaminadas com *C. albicans*. Em outro estudo, Rohrer et al.⁶³ verificaram que o tempo de exposição de lentes de contato às microondas a 700 W, necessário para inativação de *C. albicans* e de *P. aeruginosa*, foi de 4 minutos, enquanto que para *S. aureus* foi de 8 minutos. Pelczar et al.⁵³ relataram que, durante um mesmo tempo de exposição ao calor úmido, células vegetativas de leveduras e fungos são normalmente destruídas a uma temperatura menor que células vegetativas de bactérias. A completa inativação de *C. albicans*, observada no presente estudo no grupo G II, também pode ter sido favorecida pela menor aderência desse microrganismo à resina acrílica, quando comparadas com as células bacterianas, como foi verificada na análise em MEV (Figura 17).

Segundo Hiti et al.³⁴, as células biológicas são caracterizadas por apresentarem alto conteúdo de água na sua composição, justificando sua maior sensibilidade à irradiação por microondas. Assim sendo, como as células de *C. albicans* são maiores que as células bacterianas, como verificado pela análise em MEV, pode-se sugerir que o maior conteúdo de água desse fungo justifique sua sensibilidade às microondas.

De acordo com os resultados deste estudo, a irradiação por microondas a 650 W, no tempo de 1 minuto (G I), não esterilizou os corpos-de-prova contaminados com as quatro espécies de microrganismos estudados. Foram verificados valores menores de ufc/mL nos corpos-de-prova irradiados em relação às amostras do grupo controle positivo, independentemente da espécie do microrganismo avaliado (Tabela 3). Além disso, foi constatado crescimento microbiológico nos tubos de TSB após incubação por 7 dias a 37°C, para todas as quatro espécies de microrganismos (Tabela 4). A redução dos valores de ufc/mL para todos os microrganismos avaliados foi maior que 99% em relação ao grupo controle. Webb et al.⁷⁹ verificaram que a irradiação por 1 minuto a 350 W resultou em sobrevivência de 46,4% dos microrganismos avaliados, enquanto que a irradiação na potência de 604 W pelo mesmo tempo resultou em sobrevivência de 11% dos microrganismos. Os autores observaram que a irradiação a 604 W a partir de 2 minutos e a 350 W a partir de 6 minutos foi efetiva em esterilizar próteses contaminadas com *C. albicans* e *S. gordonii*. Segundo o autor, o grau de sobrevivência desses microrganismos reduziu progressivamente de acordo com o aumento do tempo de exposição às microondas. Ikawa e Rossen³⁷ submeteram esponjas de limpeza laboratorial e doméstica a diferentes tratamentos de desinfecção, entre eles, irradiação por microondas. As esponjas, contaminadas com *E. coli*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. putrefaciens*, foram umedecidas, para impedir a possibilidade de combustão, e irradiadas por 1 minuto em potência máxima,

obtendo-se 99% de inativação. Considerando os resultados obtidos no presente estudo, as amostras contaminadas com os microrganismos avaliados foram efetivamente desinfetadas após serem submetidas à irradiação por microondas pelo tempo de 1 minuto (G I).

Os resultados dos estudos de Chau et al.¹⁸ e de Lin et al.⁴⁶ indicaram que microrganismos podem penetrar nos poros de resinas acrílicas. Segundo Dixon et al.²⁵, geralmente é necessário um período superior a 48 horas para que o crescimento microbiológico seja aparente no meio de cultura, indicando que organismos viáveis podem sobreviver no interior dos poros dos materiais. Dessa forma, neste estudo, os corpos-de-prova da resina reembasadora estudada foram incubados em tubos com TSB por 7 dias a 37°C após a irradiação por microondas, a fim de se verificar a efetividade do procedimento de desinfecção a longo prazo. Foi verificado que, para os grupos G III, G IV e G V, o tratamento foi efetivo para a esterilização das amostras, uma vez que não houve crescimento microbiológico nos tubos de TSB após incubação por 7 dias. Já para o grupo G II, foi observada desinfecção das amostras contaminadas pelas bactérias estudadas, a qual foi constatada pela ausência de colônias nas placas e pela turvação em TSB de algumas amostras após a irradiação (Tabela 2). Dessa forma, é possível que, no grupo G II, os microrganismos presentes nos poros da resina estudada tenham sobrevivido ao tratamento e que a alíquota de 25 µL pipetada para o plaqueamento não contivesse células viáveis. Além disso, não foi necessário um tempo maior que 48 horas para que o crescimento bacteriano fosse constatado nos tubos de TSB. Nesse mesmo grupo (G II), a irradiação por microondas demonstrou ser fungicida para as amostras da resina estudada. Já, para o grupo G I, foi verificado, além de formação de colônias nas placas de Petri, crescimento microbiológico nos tubos de TSB com os corpos-de-prova irradiados após 24 horas de incubação, indicando que a irradiação por microondas promoveu desinfecção das amostras

estudadas. O tempo de exposição às microondas no grupo G I não foi suficiente para promover completa inativação dos microrganismos.

De acordo com a Tabela 5, foi observado crescimento dos quatro microrganismos avaliados (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *B. subtilis*) nas placas das amostras do grupo G 0 (controle positivo) após 48 horas de incubação (Figura 15). Pôde ser constatada, na Tabela 6, que os valores médios de ufc/mL das amostras contaminadas com *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram maiores que os valores das amostras inoculadas *C. albicans* e *B. subtilis*. Essas diferenças podem ser atribuídas à variabilidade morfológica e às características específicas de crescimento e adesão verificadas entre os diferentes microrganismos testados. Verran e Maryan⁷⁵ relataram que células maiores, como leveduras, são facilmente deslocadas da superfície da resina acrílica quando em comparação com células menores, como as bacterianas. Isso possivelmente pode explicar os maiores valores médios de ufc/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, uma vez que estas células bacterianas são menores quando comparadas com as formas de leveduras apresentadas pelas cepas de *C. albicans*. Além disso, as diferenças entre os padrões de crescimento bacteriano de distintas espécies podem explicar a disparidade nos valores de ufc/mL observados para as bactérias avaliadas. Segundo Pelczar et al.⁵⁴, o crescimento bacteriano em um sistema fechado, em que nenhum nutriente é adicionado e nenhum produto de excreção metabólico é removido, apresenta quatro fases de crescimento características que constituem uma curva de crescimento típica. A primeira fase (fase lag) corresponde ao período em que as células do microrganismo, imediatamente após serem inoculadas no meio, adaptam-se ao seu novo ambiente. Nesta fase, não ocorre divisão celular, porém há intensa atividade metabólica (reparo de danos celulares e síntese de enzimas e coenzimas). Na fase seguinte de crescimento, denominada fase logarítmica ou exponencial, as células dividem-se a intervalos regulares de

tempo, resultando num aumento exponencial do número de indivíduos da população. Esta fase de intensa multiplicação ocorre enquanto não há limitação de nutrientes ou acúmulo de produtos tóxicos. Em seguida, o ritmo de crescimento bacteriano diminui devido à exaustão de nutrientes e ao acúmulo de produtos tóxicos no meio de cultura, dando início à fase estacionária. Nesta fase, existe um equilíbrio entre a taxa de morte e a taxa de divisões celulares, o que mantém constante a contagem de células viáveis. A última fase do crescimento bacteriano corresponde à fase de declínio ou morte, em que a taxa de morte começa a exceder a de divisão celular, ocasionando um decréscimo exponencial no número de bactérias. Entretanto, apesar desse padrão de crescimento ser característico para todas bactérias, cada espécie de microrganismo tem seu tempo de geração particular. Assim, o tempo de duração das fases de crescimento é variável de acordo com a espécie bacteriana⁵⁴. Porém não foi encontrado na literatura o tempo de crescimento ideal para cada uma das espécies microbianas utilizadas neste estudo. Dessa forma, pode-se sugerir que as diferenças entre os valores de ufc/mL dos microrganismos avaliados neste estudo se justifiquem em função da diferença no padrão da curva de crescimento específico de cada bactéria. Desse modo, o tempo necessário para os microrganismos Sa e/ou Pa (Figura 16) atingirem a fase estacionária de crescimento provavelmente correspondeu a um tempo insuficiente para o microrganismo Bs atingir essa mesma fase, ou foi suficiente para este microrganismo alcançar a fase de declínio ou morte, uma vez que, neste estudo, todos os microrganismos foram igualmente incubados por 24 horas. Adicionalmente, os valores numericamente inferiores das médias de ufc/mL para *B. subtilis* do grupo G I foram presumivelmente causados pelo mecanismo de formação de esporos apresentado por esse microrganismo, que se inicia quando os nutrientes bacterianos se tornam escassos⁵¹. Foi demonstrado que a esporulação do *B. subtilis* é iniciada após um período

relativamente curto de crescimento³². Após a fase de crescimento das formas vegetativas, os esporos começam a se formar em 60 minutos³². Considerando esse aspecto, o microrganismo provavelmente produziu um alto número de esporos durante o período de incubação utilizado nesse estudo. Dessa forma, pode-se sugerir que as formas esporuladas, como as apresentadas pelo *B. subtilis*, são mais facilmente removidas da superfície da resina acrílica quando comparadas às formas bacterianas convencionais (*S. aureus* e *P. aeruginosa*)⁵¹. Além disso, tem sido relatado que as propriedades superficiais de uma resina acrílica podem influenciar diretamente a colonização por microrganismos⁸⁴. Essas propriedades incluem: rugosidade do substrato, perfil e energia de superfície, tensão superficial, umidade, características hidrofóbicas, interações eletrostáticas e microdureza dos materiais⁵⁹. Entretanto, ainda são necessários trabalhos futuros para avaliar o efeito das propriedades superficiais na colonização de microrganismos em resinas para reembasamento.

A esterilização dos corpos-de-prova contaminados com os microrganismos estudados após a irradiação por microondas nos tempos de 3 a 5 minutos (G III a G V) sugere que o procedimento é adequado para a esterilização da resina rígida para reembasamento estudada. Por outro lado, quando períodos de irradiação mais curtos de 1 e 2 minutos foram utilizados (G I e G II), obteve-se desinfecção das amostras, com exceção da *C. albicans* no tempo de 2 minutos (G II). Entretanto, o mecanismo pelo qual as microondas promovem inativação dos microrganismos ainda não está esclarecido na literatura. Estudos sugerem que, além do aquecimento, outros efeitos podem ser responsáveis pela inativação de microrganismos por meio das microondas^{5,17,23,26,34,64,77}. Efeitos térmicos não são causados diretamente pelo campo eletromagnético das microondas, mas são decorrentes da movimentação cinética das moléculas do material irradiado, o que acarreta em aumento de temperatura. Já os efeitos não-térmicos são

resultantes diretamente da interação do campo eletromagnético com as moléculas, produzindo efeitos que não podem ser causados apenas pela ação térmica. Uma possível explicação dos efeitos não-térmicos estaria nos vários graus de absorção da energia de microondas por certas moléculas importantes, como os ácidos nucleicos. Outros possíveis mecanismos incluem fenômenos de membrana da parede celular, que podem envolver perda de permeabilidade seletiva e ressonância molecular, resultando em clivagem⁶³. Os resultados do estudo de Fitzpatrick et al.²⁷ permitiram aos autores concluir que a esterilização obtida com a irradiação de microondas foi devido a um efeito puramente térmico, uma vez que a inativação dos microrganismos ocorreu pelo vapor produzido durante a irradiação em recipientes selados. Jeng et al.⁴⁰ criaram condições experimentais para que ampolas com esporos secos de *B. subtilis* subsp. *niger* fossem simultaneamente expostas às microondas e ao calor seco convencional, com perfil de temperatura aproximadamente idêntico. Foi observado que não houve diferença significativa entre o aquecimento convencional e por microondas na inativação dos esporos nas temperaturas de 130 e 137°C. Os autores concluíram que a inativação de esporos a seco por meio da energia de microondas é meramente em função do calor, e que os efeitos não-térmicos não são significantes nesse processo. Yeo et al.⁸² demonstraram que microrganismos em suspensão absorveram energia térmica em velocidade muito superior à do meio circundante, indicando que a inativação de suspensões de *S. aureus* pôde ser atribuída à destruição térmica por condução de calor do meio circundante para os microrganismos. Culkin e Fung²³ observaram que a irradiação por microondas de sopas contaminadas por *E. coli* e *S. typhimurium* promovia diferentes perfis de temperatura em diferentes regiões das sopas. Foi verificado que, após irradiação, a região superficial das sopas apresentava a menor sobrevivência de microrganismos, apesar dessa região não apresentar temperaturas mais

elevadas comparadas às regiões intermediárias e de fundo. Os autores concluíram que tanto o efeito térmico quanto o efeito não-térmico das microondas, ambos letais para bactérias, foram demonstrados. Porém, os resultados do estudo não indicaram a exata natureza dos efeitos letais das microondas às bactérias, se molecular, mecânico ou pelo aquecimento seletivo. Hiti et al.³⁴ relataram que a célula biológica é caracterizada por um alto conteúdo de água, o que explica a sensibilidade dos microrganismos à irradiação de microondas. Além disso, o nível de resposta molecular do sistema biológico à quantidade de energia térmica pode também explicar o efeito não-térmico das microondas⁷⁷. Os resultados obtidos por Dreyfuss e Chipley²⁶ também sugerem que a irradiação em microondas, mesmo em doses subletais, causaria danos à integridade celular, uma vez que culturas de *S. aureus* irradiados sofreram maior lise do que células tratadas termicamente em banho-de-água. Atmaca et al.⁵ relataram que o efeito da irradiação por microondas é diferente do efeito térmico, já que a redução na contagem de colônias de bactérias irradiadas por microondas foi significativa em relação à contagem obtida após aplicação de calor convencional nas suspensões dos microrganismos. Segundo Carrol e Lopez¹⁷, há três formas em que a energia eletromagnética pode causar a destruição das células microbiológicas. Dependendo da composição química da célula e do meio circundante, o calor pode ser gerado mais rapidamente na célula do que no meio, levando à destruição desta. Uma outra forma de inativação celular seria devido à oscilação gerada pelo campo eletromagnético de alta frequência das microondas, que excederia os limites elásticos da célula, rompendo-a. Adicionalmente, a energia de rádio-freqüência pode ser absorvida por moléculas orgânicas críticas da célula, como proteínas essenciais e DNA, que podem ser desnaturadas irreversivelmente. Campanha¹⁵ verificou que suspensões leveduriformes submetidas à irradiação por microondas a 650 W, durante 6 minutos, apresentaram valores

significativamente menores de contagem celular e maiores de substâncias liberadas em relação a suspensões controle (não irradiadas). A distinção entre células íntegras e não íntegras foi realizada com base na entrada do corante azul de metileno no interior das células, que é uma forma indireta de se avaliar a integridade de membrana e parede celulares. Não foram encontradas células íntegras na suspensão irradiada, indicando alteração na permeabilidade ou na integridade dessas estruturas. Além disso, as células dessa suspensão perderam sua característica de refringência, apesar de preservarem sua morfologia leveduriforme elipsoidal. Também foi demonstrado que, após a irradiação por microondas, foram liberados pelas células moléculas de proteínas, eletrólitos (K^+ , Ca^{++}) e ácidos nucleicos em concentração significativamente maior em relação ao controle. Porém, apesar de ter sido verificada inativação celular após a irradiação, a densidade óptica e a concentração celular não foram alteradas em relação às suspensões controle, indicando que não houve completa desintegração celular.

A análise em MEV das amostras esterilizadas indicou alteração na morfologia das células após a irradiação, como irregularidades de superfície, orifícios, modificação da forma e também desintegração celular. Além disso, para *C. albicans*, foi observado que a irradiação das amostras em água removeu parte dos microrganismos não viáveis da superfície da resina acrílica, o que não foi verificado com as bactérias avaliadas, as quais permaneceram na superfície da resina após a imersão em água e a irradiação por microondas. Verran e Maryan⁷⁵ relataram que células de leveduras, por serem maiores, são mais facilmente deslocadas da superfície da resina acrílica em relação às células bacterianas, o que justifica as constatações verificadas na análise em MEV deste estudo. Rosaspina et al.⁶⁴ demonstraram que as microondas promoveram alterações nos microrganismos diretamente proporcionais ao tempo de exposição utilizado,

com a completa destruição das células de *C. albicans* ao final da irradiação. Os autores também observaram que essas alterações não ocorreram nas células submetidas a aquecimento térmico convencional em banho de água, o que os levaram a sugerir um efeito mais complexo das microondas nos microrganismos, além do térmico. Para as amostras esterilizadas deste estudo, as fotomicrografias dos corpos-de-prova após 7 dias da irradiação apresentaram-se similares àquelas referentes às amostras observadas imediatamente após irradiação com microondas.

Adicionalmente, é necessário considerar o efeito do método de desinfecção proposto sobre as propriedades físicas e mecânicas dos materiais utilizados para a confecção de próteses. Alguns estudos na literatura avaliaram o efeito da água em ebulição sobre algumas propriedades de resinas acrílicas^{10,38,61,70}. Shim e Watts⁷⁰ relataram que um ciclo de termopolimerização adicional a 100°C, por 2 horas, promoveu uma redução significativa nas concentrações de monômero residual, favorecendo propriedades mecânicas de resinas acrílicas para base de prótese. Beech¹⁰ observou que o tratamento térmico em água em ebulição a 100°C, por 2 horas, aumentou o grau de conversão do monômero em polímero de resinas termopolimerizáveis. Em um estudo de Inoue et al.³⁸, foi observado que o banho de água a 100°C, por 1 hora, melhorou as propriedades viscoelásticas e reduziu a porcentagem de monômero residual de resinas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis. Além disso, Robinson et al.⁶¹ demonstraram que um banho de água a 95°C aumentou significativamente a resistência à flexão de uma resina acrílica autopolimerizável e duas resinas acrílicas termopolimerizáveis. Ribeiro⁶⁰ avaliou o efeito da irradiação por microondas sobre as propriedades mecânicas de resistência à flexão e dureza de resinas acrílicas (Kooliner, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C, New Truliner e Lucitone 550). Para a irradiação, cada corpo-de-prova foi individualmente imerso em 200 mL de água destilada e submetido a dois

ciclos de irradiação a uma potência constante de 650 W, variando-se o tempo de exposição (0 a 5 minutos). Os resultados demonstraram que, para a resina Kooliner, a elevação no tempo de exposição às microondas promoveu aumento na resistência à flexão em todos os tempos avaliados, porém esse aumento foi significativo somente após 5 minutos de irradiação, em comparação ao controle. A resistência à flexão dos materiais Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard C, New Truliner e Lucitone 550 não foi alterada pelos tempos de desinfecção testados. Foi demonstrado que a dureza Vickers da resina Kooliner aumentou significativamente após 3, 4 e 5 minutos de irradiação em relação ao controle. Para a resina Ufi Gel Hard C, o aumento significativo em relação ao controle ocorreu em 4 e 5 minutos. Já, para New Truliner, apenas a média de dureza após 5 minutos de irradiação foi significativamente maior que o controle. Os valores de dureza da resina para base de prótese Lucitone 550 não foram significativamente alterados pelos tempos de desinfecção avaliados, quando comparados ao controle. Portanto, foi verificado que a desinfecção em microondas não ocasionou efeitos deletérios na resistência à flexão e dureza dos materiais avaliados, independente do tempo de irradiação utilizado.

Com base nos resultados deste estudo, a irradiação por microondas a 650 W por 3, 4 e 5 minutos provou ser um método efetivo para a esterilização da resina rígida para reembasamento estudada. Entretanto, quando tempos de irradiação mais curtos foram utilizados (1 e 2 minutos), obteve-se desinfecção dos corpos-de-prova. Porém, a interpretação dos resultados deste trabalho científico deve ser realizada cuidadosamente, sendo ainda necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem o efeito da irradiação por microondas em próteses, uma vez que estas apresentam uma superfície maior e mais complexa em relação ao corpo-de-prova. Além disso, é necessária a realização de estudos clínicos

longitudinais que possibilitem avaliar se a irradiação por microondas poderia ser efetiva no tratamento de patologias infecciosas bucais.

7 Conclusão

Com base nas condições experimentais deste estudo e de acordo com a metodologia empregada, pôde-se concluir que:

1. Todos os corpos-de-prova contaminados com *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *B. subtilis* e irradiados durante 3, 4 e 5 minutos foram esterilizados pelas microondas;
2. Os corpos-de-prova contaminados com *C. albicans* e irradiados durante 2 minutos foram esterilizados pelas microondas;
3. Os corpos-de-prova contaminados com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* e irradiados durante 2 minutos não foram esterilizados pelas microondas;
4. Todos os corpos-de-prova contaminados com *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *B. subtilis* e irradiados durante 1 minutos apresentaram 99% de redução dos microrganismos;
5. A análise em MEV dos corpos-de-prova esterilizados revelou evidência de alterações morfológicas nas células dos microrganismos avaliados.

8 Referências*

1. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. COUNCIL ON DENTAL MATERIALS, INSTRUMENTS AND EQUIPMENT. Denture cleansers. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 106, n.1, p. 77-79, Jan. 1983.
2. ARIMA, T.; MURATA, H.; HAMADA, T.. Properties of highly cross-linked autopolymerizing reline resins. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.73, n.1, p.55-59, Jan. 1995.
3. ASAD, T.; WATKINSON, A.C.; HUGGETT, R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.68, n.1, p.191-195, July 1992.
4. ASAD, T.; WATKINSON, A.C.; HUGGETT, R. The effects of various disinfectant solutions on the surface hardness of an acrylic resin denture base material. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.6, n.1, p.9-12, Jan./Feb. 1993.
5. ATMACA, S. et al. Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, Budapest, v.43, n.4, p.371-378, 1996.
6. AZEVEDO, A. et al. The development of surface hardness in hard chairside reline resins. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.79, n.5, p.1160, 2000. Abstract B-352.
7. BACKENSTOSE, W.M.; WELLS, J.G. Side effects of immersion-type cleansers on the metal components of dentures. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis; v.37, n.6, p.615-621, June 1977.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

-
8. BANTING, D.W.; HILL, S.A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec. Care Dentist.**, Chicago, v.21, n.1, p. 4-8, 2001.
 9. BAYSAN, A.; WHILEY, R.; WRIGHT, P.S. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.79, n.4, p.454-458, Apr. 1998.
 10. BEECH, D.R. Molecular weight distribution of denture base acrylic. **J. Dent.**, Guildford, v.3, n.1, p.19-24, Jan. 1975.
 11. BELL, J.A. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 61, n.5, p.580-583, May 1989.
 12. BORDER, B.G.; RICE-SPEARMAN, L. Microwaves in the laboratory: effective decontamination. **Clin. Lab. Sci.**, Bethesda, v.12, n.3, p.156-160, May/June 1999.
 13. BRACE, M.L.; PLUMMER, K.D. Practical denture disinfection. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 70, n.6, p. 538-540, Dec. 1993.
 14. BUNCH, J.; JOHNSON, G.H.; BRUDVIK, J.S. Evaluation of hard direct relined resins. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.57, n.4, p.512-519, Apr. 1987.
 15. CAMPANHA, N.H. *Efeito da irradiação com microondas sobre células de Candida albicans*. Araraquara, 2005. 156p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
 16. CAMPANHA, N.H. et al. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. **J. Prosthet Dent.**, St. Louis. No prelo.

17. CARROL, D.E.; LOPEZ, A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. **J. Food. Sci.**, Champaign; v. 34, p.320-324, 1969.
18. CHAU, V.B. et al. In-depth disinfection of acrylic resins. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.74, n.3, p. 309-313. Sept. 1995.
19. COLE, E.C.; ROBISON, R. Test methodology for evaluation of germicides. In: ASCENZI, J.M. **Handbook of disinfectants and antiseptics**. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. p.1-13.
20. CUCCI, A.L.M. et al. Unrestricted linear dimensional changes of two chairside reline resins and one heat-curing acrylic resin. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.76, n.4, p.414-417, Oct. 1996.
21. CUCCI, A.L.M. et al. Resinas para reembasamento imediato: resistência à tração e alongamento. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.27, n.1, p.299-309, Jan./June 1998.
22. CUCCI, A.L.M. et al. Tensile bond strength of hard chairside reline resins as influenced by water storage. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.26, n.8, p.631-634, Aug. 1999.
23. CULKIN, K. A.; FUNG, D.Y.C. Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. **J. Milk Food Technol.**, Ames, v. 38, n. 1, p.8-15, Jan. 1975.
24. DAVENPORT, J.C. The denture surface. **Br. Dent. J.**, London, v.133, n.3, p.101-105, Aug.1972.
25. DIXON, D.L.; BREEDING, L.C.; FALER, T.A. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.81, n.2, p.207-214, Feb. 1999.
26. DREYFUSS, M.S.; CHIPLEY, J.R. Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.39, n.1, p.13-16, Jan. 1980.

-
27. FITZPATRICK, J.A.; KWAO-PAUL, J.; MASSEY, J. Sterilization of bacteria by means of microwave heating. **J. Clin. Eng.**, Frederick, v.3, n.1, p.44-47, Jan./Mar. 1978.
 28. FRIEDRICH Jr., E.G.; PHILLIPS, L.E. Microwave sterilization of *Candida* on underwear fabric. A preliminary report. **J. Reprod. Med.**, St. Louis, v.33, n.5, p.421-422, May 1988.
 29. FURUKAWA, K.K. et al. Effectiveness of chlorine dioxide in disinfection on two soft denture liners. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.80, n.6, p.723-729, Dec. 1998.
 30. GOODSON, L.B. et al. A statistical comparison of denture sanitation using a commercially available denture cleaner with and without microwaving. **Gen. Dent.**, Chicago, v.51, n.2, p.148-151, Mar./Apr. 2003.
 31. GRIFFITH, D. et al. Microwave sterilization of polyethylene catheters for intermittent self-catheterization. **Aust. N. Z. J. Surg.**, Carlton, v.63, n.3, p.203-204, Mar. 1993.
 32. HAUSER, P.M.; ERRINGTON, J. Characterization of cell cycle events during the onset of sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** Washington, v.177, n.14, p. 3923-3931, July 1995.
 33. HENDERSON, C.W. et al. Evaluation of the barrier system, an infection control system for the dental laboratory. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.58, n.4, p.517-521, Oct. 1987.
 34. HITI, K. et al. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. **Cornea**, New York, v.20, n.5, p.467-470, July 2001.
 35. HOFFMAN, P.N.; HANLEY, M.J. Assessment of a microwave-based clinical waste decontamination unit. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.77, n.6, p.607-612, Dec. 1994.
 36. HUME, W.R.; MAKINSON, O.F. Sterilizing dental instruments: evaluation of lubricating oils and microwave radiation. **Oper. Dent.**, Seattle, v.3, n.3, p.93-96, 1978.

-
37. IKAWA, J. Y.; ROSSEN, J. S. Reducing bacteria in household sponges. **J. Environ. Health.**, Denver, v.62, n.1, p.1-5, July/Aug. 1999.
 38. INOUE K. et al. Effect of residual monomer on viscoelastic properties of pour denture base resins. **Dent. Mater. J.**, Tokyo, v.2, n.2, p.192-197, Dec. 1983.
 39. JASNOW, S.B.; SMITH J.L. Microwave sanitization of color additives used in cosmetics: feasibility study. **Appl. Microbiol.**, Washington, v.30, n.2, p.205-211. Aug. 1975.
 40. JENG D.K. et al. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.53, n.9, p.2133-2137. Sep. 1987.
 41. KAHN, R.C.; LANCASTER, M.V.; KATE Jr., W. The microbiologic cross-contamination of dental prostheses. **J Prosthet Dent.**, St. Louis, v.47, n.5, p.556-559, May 1982.
 42. KATBERG Jr., J.W. Cross-contamination via the prosthodontic laboratory. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.32, n.4, p.412-419, Oct. 1974.
 43. LATIMER, J.M.; MATSEN, J.M. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.6, n.4, p.340-342, Oct. 1977.
 44. LELES, C.R. et al. Bonding strength between a hard chairside reline resin and a denture base material as influenced by surface treatment. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.28, n.12, p.1153-1157, Dec. 2001.
 45. LIATSIKOS, E.N. et al. Transurethral microwave thermotherapy for the treatment of prostatitis., **J. Endourol.**, New York, v.14, n.8, 689-692, Oct. 2000.
 46. LIN, J.J. et al. Disinfection of denture base acrylic resin. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.81, n.2, p.202-206, Feb. 1999.

-
47. MACHADO CUCCI, A.L. et al. Water sorption, solubility and transverse bond strength of two acrylic resins and one heat-polymerizing acrylic resin. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.80, n.4, p.434-438, Oct. 1998.
48. MERCHANT, V.A. An update on infection control in the dental laboratory. **Quintessence Dent. Technol.**, Chicago, p.157-65, 1997.
49. MURPHY, W.M. et al. Rigid cold curing resins for direct use in the oral cavity. **Br. Dent. J.**, London, v.160, n.11, p.391-394, June 1986.
50. NAJDOVSKI, L.; DRAGAS, A.Z.; KOTNIK, V. The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. **J. Hosp. Infect.**, San Diego, v.19, n.4, p.239-247, Dec. 1991.
51. NEPELENBROEK, K.H. et al. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside relines resins. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.16, n.6, p.616-620, Nov./Dec. 2003.
52. PAVARINA, A.C. et al. Effect of microwave disinfection on flexural strength of hard chairside relines resins. **J. Dent.**, Guildford, No Prelo.
53. PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Controle de microrganismos: fundamentos e agentes físicos. In: _____. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, cap. 7, p. 189-209.
54. PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Cultivo e crescimento de microrganismos. In: _____. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, cap. 6, p. 166-188.
55. PEREZ, L.E.C. Desinfecção de resinas para reembasamento. Efeito sobre dureza e rugosidade superficial. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, XIV, 2002, Presidente Prudente. **Anais...** Presidente Prudente: UNESP, 2002. 1 CD-Rom.

-
56. PEREZ, L.E.C. et al. Estabilidade dimensional de resinas para reembasamento imediato após desinfecção em microondas. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.16, Supl., p.76, 2002. Resumo Ib124.
57. POLYZOIS, G.L.; ZISSIS, A.J.; YANNIKAKIS, S.A. The effect of glutaraldehyde and microwave disinfection on some properties of acrylic denture resin. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.8, n.2, p.150-154, Mar./Apr. 1995.
58. POWELL, G.L. et al. The presence and identification of organisms transmitted to dental laboratories. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 64, n.2, p. 235-237, Aug. 1990.
59. RADFORD, D.R.; CHALLACOMBE, S.J.; WALTER, J.D. Adherence of phenotypically switched *Candida albicans* to denture base materials. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v. 11, n.1, p.75-81, Jan./Feb. 1998.
60. RIBEIRO, D.G. *Efeito da desinfecção por microondas sobre a resistência à flexão e dureza de resinas acrílicas para reembasamento imediato*. Araraquara, 2004. 193p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
61. ROBINSON, J.G.; McCABE, J.F.; STORER, R. Denture bases: the effects of various treatments on clarity, strength and structure. **J. Dent.**, Guildford, v.15, n.4, p.159-165, Aug. 1987.
62. ROHRER, M.D.; BULARD, R.A. Microwave sterilization. **J. Am. Dent. Assoc.** Chicago, v.110, n.2, 194-198, Feb.1985.
63. ROHRER, M.D. et al. Microwave sterilization of hydrophilic contact lenses. **Am. J. Ophthalmol.** New York, v. 101, n.1, p. 49-57. Jan. 1986.
64. ROSASPINA, S. et al. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. **Microbios**, Cambridge, v.78, n.314, p.55-59, 1994.

-
65. RUDD, R.W. et al. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis v.51, n.3, p.318-321, Mar. 1984.
66. SANBORN, M.R.; WAN, S.K.; BULARD, R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v.44, n.4, Oct. 1982.
67. SEÓ, R.S. et al. In vitro toothbrushing abrasion of denture base and relined resins. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.80, n.4, p.1097, Apr. 2001. Abstract 782.
68. SEÓ, R.S. et al. Effect of microwave irradiation on the flexure strength of one hard chairside relined resin. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.81, n.4, p.A-170, Mar. 2002. Abstract 1216.
69. SHEN, C.; JAVID, N.S.; COLAIZZI, F.A. The effect of glutaraldehyde base disinfectants on denture base resins. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.61, n.5, p.583-589, May 1989.
70. SHIM, J.S.; WATTS, D.C. Residual monomer concentrations in denture-base acrylic resin after an additional, soft-liner, heat-cure cycle. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.15, n.4, p.296-300, July 1999.
71. SILVA, M.M. et al. Efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais contaminadas por *C. albicans*. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 18, Suppl., p. 145-145, sep. 2004.
72. TAKAHASHI, Y.; CHAI, J.; KAWAGUCHI, M. Strength of relined denture base polymers subjected to long term water immersion. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.13, n.3, p.205-258, May/June 2000.
73. TAKAHASHI, Y.; KAWAGUCHI, M.; CHAI, J. Flexural strength at the proportional limit of a denture base material relined with four different denture relined material. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.10, n.6, p.508-512, Nov./Dec. 1997.

-
74. TARANTINO, L. et al. L'impiego di un apparecchio a microonde nella sterilizzazione di strumentario odontoiatrico: possibilità e limiti. **Minerva Stomatol.**, Torino, v.46, n.10, p.561-566, Oct. 1997.
75. VERRAN, J.; MARYAN, C.J. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.77, n.5, p.535-539, May 1997.
76. VERRAN, J.; KOSSAR, S.; MCCORD, J.F. Microbiological study of selected risk areas in dental technology laboratories. **J. Dent.**, Guildford, v.24, n.1/2, p.77-80, Jan./Mar. 1996.
77. WATANABE, K. et al. Effect of ionic strength on the inactivation of microorganisms by microwave irradiation. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.31, n.1, p.52-56, July 2000.
78. WAKEFIELD, C.W. Laboratory contamination of dental prostheses. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.44, n.2, p.143-146, Aug. 1980.
79. WEBB, B.C. et al. Effectiveness of two methods of denture sterilization. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.25, n.6, p.416-423, June 1998.
80. WILLIAMS, H.N. et al. The recovery and significance of nonoral opportunistic pathogenic bacteria in dental laboratory pumice. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.54, n.5, p.725-730, Nov. 1985.
81. WU, Q. Effect of high-power microwave on indicator bacteria for sterilization. **IEEE Trans. Biomed. Eng.**, New York, v.43, n.7, p.752-754, July 1996.
82. YEO, C.B. et al. Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation. **J. Appl. Microbiol.**, Melbourne, v.87, n.3, p.396-401, Sept. 1999.
83. YOUNG, S.K. et al. Microwave sterilization of nitrous oxide nasal hoods contaminated with virus. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.60, n.6, p.581-585, Dec. 1985.

84. ZISSIS, A.J. et al. Roughness of denture materials: a comparative study. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.13, n.2, p.136-140, Mar./Apr. 2000.

MIMA, E.G.O. Efeito do tempo de irradiação sobre a efetividade da desinfecção em microondas de uma resina para reembasamento. Araraquara, 2005. 150 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este estudo avaliou a efetividade de diferentes tempos de irradiação por microondas na desinfecção de uma resina rígida para reembasamento imediato. Duzentos e quarenta corpos-de-prova (10 x 10 x 1 mm) da resina reembasadora rígida Tokuso Rebase Fast foram confeccionados e esterilizados por meio de óxido de etileno. Os corpos-de-prova foram então individualmente inoculados (10^7 ufc/mL) com meio de cultura de Tryptic Soy Broth (TSB) contendo um dos microrganismos avaliados (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *B. subtilis*). Após 48 h de incubação a 37°C, os corpos-de-prova foram agitados por 1 min e deixados em repouso por 9 min, seguido de nova agitação para suspender qualquer microrganismo aderente. Após a inoculação, os corpos-de-prova foram divididos em 6 grupos, cada um com 10 amostras para cada microrganismo. Os corpos-de-prova foram individualmente imersos em 200 mL de água e submetidos à irradiação em microondas, a uma potência de 650 W em um dos seguintes tempos experimentais: G I - 1 min; G II - 2 min; G III - 3 min; G IV - 4 min e G V - 5 min. Quarenta amostras não irradiadas (G 0) serviram como controle positivo. A seguir, 25 µL da suspensão resultante das diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} foram semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos para cada microrganismo. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após a incubação, as colônias foram quantificadas em ufc/mL e os dados analisados estatisticamente pelos

testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Os corpos-de-prova irradiados foram imersos em meio de cultura e incubados a 37°C por 7 dias. Quarenta e quatro corpos-de-prova foram preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com os resultados, todos os corpos-de-prova dos grupos G III, G IV e G V demonstraram efetiva esterilização após a irradiação em microondas. Para o grupo G II, as amostras contaminadas com *C. albicans* também foram esterilizadas após a irradiação. As amostras do grupo G II inoculadas com *S. aureus*, *B. subtilis*, e *P. aeruginosa* apresentaram crescimento microbiológico (turbidez) após 7 dias de incubação. Todos os corpos-de-prova do grupo G I apresentaram crescimento microbiológico após incubação por 48 h e 7 dias. A análise em MEV indicou alteração na morfologia celular dos microrganismos presentes nas amostras esterilizadas. A irradiação por microondas a 650 W demonstrou ser, para resina reembasadora rígida, um método de esterilização efetivo quando tempos de 5, 4 e 3 minutos são utilizados.

Palavras-chave: 1. Reembasadores de dentadura 2. Esterilização
3. Microondas 4. Infecção – Transmissão

MIMA, E.G.O. Effectiveness of different exposure time on microwave disinfection of a hard chairside reline resin. Araraquara, 2005. 150 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of microwave disinfection of a hard chairside reline resin after different exposure times. Two hundred-forty specimens (10 x 10 x 1 mm) of the reline resin Tokuso Rebase Fast were fabricated and subjected to ethylene oxide sterilization. The specimens were then individually inoculated (10^7 cfu/mL) with Tryptic Soy Broth media (TSB) containing one of the tested microorganisms (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C.albicans* and *B. subtilis*). After 48 hours at 37°C, the samples were vortexed for 1 minute and allowed to stand for 9 minutes followed by a short vortex to resuspend any organisms present. After inoculation, the specimens were divided into six groups to provide a sample size of ten for each microorganism. Each specimen was individually immersed in 200 mL of water and subjected to microwave irradiation at 650 W during one of the following exposure times: G I – 1 min, G II – 2 min, G III – 3 min, G IV – 4 min and G V – 5 min. Forty non-irradiated specimens (G 0) were used as positive controls. Replicate specimens (25 µL) of suspension were plated at dilutions of 10^{-3} to 10^{-6} on plates of selective media appropriate for each organism. All plates were incubated at 37°C for 48 hours. After incubation, colonies were counted (cfu/mL) and the data were statistically analyzed by the Kruskal-Wallis's and the Dunn's tests. Forty-four specimens of each material were prepared for SEM. All specimens of G III, G IV and G V groups showed consistent sterilization of all microorganisms after

microwave irradiation. Specimens of G II group inoculated with *C. albicans* were also sterilized after microwave irradiation. Specimens of G II inoculated with *S. aureus*, *B. subtilis*, and *P. aeruginosa* showed microbial growth (turbidity) after 7-day incubation. The specimens of G I demonstrated positive cultures for all microorganisms after 48 h and 7-day incubation. SEM examination indicated alteration in cell morphology of sterilized specimens. Microwave irradiation at 650 W proved to be effective for the sterilization of the hard chairside relines after 3, 4 and 5 minutes of exposure.

Key words: 1. Denture relines 2. Sterilization 3. Microwave
4. Infection-Transmission